

**Der antibakterielle Effekt von drei
verschieden funktionalisierten TiOB[®]
Oberflächen auf *Staphylococcus
aureus***

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von Tobias Lesser

Geboren am 20.10.1988 in Jena

Gutachter

1: Univ.-Prof. Dr. Dr. B. W. Sigusch, Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, Universitätsklinikum Jena

2: Prof. Dr. R. Heinrich-Weltzien, Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde und Kinderzahnheilkunde, Universitätsklinikum Jena

3: Prof. Dr. A. Güntsch, Chair of the Department of Surgical Sciences, Marquette University Milwaukee

Tag der öffentlichen Verteidigung: 3.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Wortabkürzungen	III
Physikalische Größen	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	4
2.1 Titan als Implantatmaterial	5
2.2 Implantat-assoziierte Infektionen.....	5
2.2.1 Entstehung des bakteriellen Biofilms	5
2.2.2 Staphylococcus aureus.....	7
2.3 Antiinfektiöse Oberflächen	8
2.4 Verfahren zur Oberflächenbeschichtung von Titanimplantaten	11
2.4.1 Plasmachemische Oxidation.....	11
2.4.2 APCVD Verfahren.....	13
2.4.3 Dip Coating	13
3 Ziele der Arbeit	15
4 Methodik.....	16
4.1 Probekörper	16
4.2 Funktionalisierung der TiOB Oberflächen mit antibakteriellen Wirkstoffen:.....	17
4.2.1 Oberflächenfunktionalisierung mit Tannin/Gentamicin	17
4.2.2 Oberflächenfunktionalisierung mit SiOx Ag.....	17
4.2.3 Oberflächenfunktionalisierung mit Zink	19
4.3 Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS).....	19
4.4 Experimentelle Gruppen.....	20

4.5	Mikrobiologische Tests	20
4.5.1	Agardiffusionstest/Freisetzungskinetik	21
4.5.2	Proliferationstest	21
4.5.3	Zytotoxizitätstest	22
4.6	Statistik	23
5	Ergebnisse	24
5.1	Probekörper	24
5.2	Mikrobiologische Tests	25
5.3	Zytotoxizitätstest	31
6	Diskussion	34
7	Schlussfolgerungen	44
8	Literaturverzeichnis	45
9	Anhang	53
9.1	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9.2	Danksagung	53
9.3	Ehrenwörtliche Erklärung	54

Abkürzungsverzeichnis

Wortabkürzungen

Abk.	Erklärung
Ag	Silber
Al	Aluminium
APCVD	Atmospheric-Pressure Plasma-Assisted Vapour Deposition (plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung unter Atmosphärendruck)
At.-%	Atomprozent
ATCC	American Type Culture Collection (Unternehmen)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	Fötales Bovines Serum
FDA	Fluoreszindiacetat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HMDSO	Hexamethyldisiloxan
HO·	Hydroxyl-Radikal
MC3T3	Maus-Osteoblasten der Zelllinie MC3T3
MEM	Minimal Essential Medium (Minimum essential Medium)
NaOH	Natriumhydroxid

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
NP	Nano Particles (Nanopartikel)
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
OD	Optical Density (optische Dichte)
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCO	Plasmachemical Oxidation (plasmachemische Oxidation)
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
Ph. Eur.	Pharmaceutical Purity (pharmazeutische Reinheit)
PLA	Poly lactid (Polymilchsäure)
PLLA	Poly L-Lactid Acid (Poly L-Milchsäure)
PDLLA	Poly D, L-Lactid Acid (Poly D,L-Milchsäure)
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoff-Radikale)
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. epidermidis	Staphylococcus epidermidis
SE2	Secondary Electron
SiOx	Siliziumoxid
Ti	Titan
TiAl6V4	Titan-Aluminium-Vanadium
TiOB	patentierte Titanoxidbeschichtung der Firma INNOVENT
TS	Tryptose-Soybean (Trypton-Soja Agar)
XPS	Röntgen-Photoelektronenspektroskopie
Zn	Zink
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$	Zinkacetat

Physikalische Größen

Formelzeichen	Größe	Einheit
l	Länge	m
m	Masse	kg
I	Stromstärke	A
t	Zeit	s
n	Stoffmenge	mol
W	Arbeit	J
T	Temperatur	°C
M	Molare Masse	kg/mol
p	Druck	Pa
U	Spannung	Volt
E	Energie	eV

1 Zusammenfassung

Implantat-assoziierte Infektionen gelten als gefürchtete Komplikationen in der orthopädischen Chirurgie und führen in den meisten Fällen zum Implantatverlust.

Staphylococcus aureus wird dabei als Schlüsselbakterium der Implantat-assoziierten Infektion diskutiert (Doll et al. 2016).

Funktionalisierte Implantat-Oberflächen, die simultan osteoinduktiv und antibakteriell wirken, könnten zum einen die rigide Fixation von Implantaten verbessern und zum anderen Implantat-assoziierte Infektionen verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurden die durch die Firma INNOVENT entwickelten und patentierten Titan-Oberflächen (TiOB[®] Oberflächen), deren verbesserte Knochenfixation im Vergleich zu herkömmlichen Titan-Implantaten bereits nachgewiesen wurde (Diefenbeck et al. 2011), als Grundbeschichtung verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob TiOB[®] Oberflächen mit den antiinfektösen Agenzien Gentamicin, Silber oder Zink funktionalisiert werden können und ein antibakterieller Effekt bei gleichzeitig guter Biokompatibilität nachweisbar ist.

Durch die Firma INNOVENT wurden 6 scheibenförmige sowie 56 zylindrische TiOB[®] Tannin/Gentamicin-, TiOB[®] SiO_x Ag- und TiOB[®] Zn- Probekörper je Oberflächenvariante durch verschiedene Kopplungsverfahren hergestellt.

Die antibakterielle Potenz dieser Oberflächen wurde im Agardiffusionstest und Proliferationstest auf *S. aureus* getestet.

Im Agardiffusionstest wurde die Freisetzungskinetik der antibakteriellen Agenzien aus den Testoberflächen bestimmt. Dabei wurden die zylindrischen Probekörper in PBS-Lösung zunächst über verschiedene Zeiträume (2, 4, 6, 12, 24, 48 h) gelagert, im Anschluss die entstandenen Eluate entnommen, in ausgestanzte Löcher auf einem TS Agar mit proliferierender *S. aureus* Kultur überführt und nach 24 Stunden die Inhibitionszonen ausgemessen. Es wurde gezeigt, dass die Eluate der TiOB[®] Tannin/Gentamicin Oberflächen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 h eine bakterieninhibierende Wirkstoffkonzentration erzielen.

Eluate der TiOB[®] SiOx Ag und TiOB[®] Zn Probekörper erzeugten dagegen keine Inhibitionszonen.

Im Proliferationstest wurde die Vermehrungsfähigkeit von *S. aureus* nach direktem Kontakt zu den funktionalisierten Oberflächen untersucht. Die Beurteilung des antibakteriellen Effektes erfolgte anhand des verzögerten Anstiegs der Proliferationskurven (Latenzphase) sowie einer geringeren Bakteriendichte von *S. aureus* nach dem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 19.0 für Windows. Die Signifikanz im Proliferationstest wurde mit Hilfe des *one-way ANOVA* getestet und die Bonferoni-Korrektur diente der Neutralisierung der Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen. Die Unterschiede der gemessenen Daten sind signifikant bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$.

Die funktionalisierten Oberflächen bewirkten ein verzögertes Bakterienwachstum sowie eine geringe Bakteriendichte in den Testansätzen von bis zu 10 h für TiOB[®] Zn, 8 h für TiOB[®] SiOx Ag und 5 h für TiOB[®] Tannin/Gentamicin gegenüber der Kontrollgruppe TiOB[®] ohne zusätzliche Funktionalisierung.

Eine vorangegangene Exposition der funktionalisierten Oberflächen in dem entsprechenden Eluationsmedium (PBS) führte zu einer zeitabhängigen Reduktion der antibakteriellen Wirkung.

Für die TiOB[®] Tannin/Gentamicin und für die TiOB[®] Zn Oberflächen konnte auch nach maximaler Exposition (48 h) der Probekörper ein signifikanter wachstums-inhibierender Effekt auf die Vermehrungsfähigkeit von *S. aureus* beobachtet werden, während allerdings TiOB[®] SiOx Ag Oberflächen nur nach kurzer Exposition von 0 und 4 h zu einem signifikant verminderten Bakterienwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe TiOB[®] führten.

Die Untersuchung der Zytotoxizität der Testoberflächen erfolgte anhand 6 scheibenförmiger Probekörper je Oberflächenvariante im Direktkontakttest gegenüber einer Maus-Osteoblasten Zelllinie (MC3T3-E1) und anschließender Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung. Der t-test diente der Überprüfung signifikanter Unterschiede der Zellzahl. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

Im Zytotoxizitätstest wurden alle Oberflächen mit MC3T3-Zellen besiedelt. Es konnte ermittelt werden, dass die antibakteriellen Mechanismen sich wahrscheinlich auch auf die Biokompatibilität der Probekörper auswirkten.

Im Zeitverlauf nahm die Biokompatibilität nach anfänglicher Reduktion gegenüber MC3T3-Zellen wieder zu. Vor allem TiOB® SiOx Ag Oberflächen wiesen nach längerer Inkubationszeit (4 Tage) einen ähnlich dichten Zellrasen auf wie die Kontrollgruppe TiOB®.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass durch Funktionalisierung von TiOB® Oberflächen mit antibakteriellen Agenzien eine signifikante Reduktion der Vermehrungsfähigkeit von *S. aureus* erzielt werden kann.

Die antibakterielle Effizienz der funktionalisierten TiOB® Oberflächen wird wahrscheinlich die osteointegrativen Eigenschaften nicht wesentlich beeinträchtigen.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass die in der vorliegenden Studie untersuchten funktionalisierten TiOB® Oberflächen sowohl antibakterielle Effekte aber auch gute Biokompatibilitätseigenschaften aufweisen.

2 Einleitung

Biomaterialien sind seit hundert Jahren in der Medizin eingesetzte Werkstoffe, die über einen längeren Zeitraum mit dem Organismus direkt in Kontakt stehen (Williams und Biomaterials 1987). So dienten schon vor 1000 Jahren u.a. Goldfäden als Nähte bei Operationen, Silber und Gold als künstliche Kronen und Edelsteine als Zahnersatz (Ratner et al. 2004).

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts hat die Entwicklung von Biomaterialien einen großen Fortschritt gemacht und sich als ein fester Bestandteil der modernen Medizin etabliert. Laut aktuellem Statusbericht (Stand 2014) des Endoprothesenregisters werden allein in deutschen Krankenhäusern jährlich rund 390.000 Operationen durchgeführt, bei denen künstliche Hüft- und Kniegelenke eingesetzt werden. Damit gehört dieser Eingriff zu den häufigsten Operationen in Deutschland (Hassenpflug 2014) .

Auch im Bereich der Zahnmedizin ist die Implantologie inzwischen nicht mehr aus dem Therapiespektrum wegzudenken. In den vergangenen 30 bis 40 Jahren hat sich in dabei eine Entwicklung vollzogen, die als eine der bedeutendsten in der Zahnheilkunde bezeichnet werden kann.

Als eine der wichtigsten wissenschaftlichen Durchbrüche galt die Entdeckung und Anwendung der Osseointegration von Knochen und Fremdkörpern durch den schwedischen Orthopäden Per-Ingvar Brånemark im Jahr 1967 (Hartmann 2009).

Unter allen Implantatmaterialien haben sich Titan und Titanlegierungen dabei sowohl für orthopädische als auch für dentale Implantate als zuverlässigste Verbindung zum Knochen erwiesen (Wintermantel und Ha 2008).

Seit der wissenschaftlichen Anerkennung der zahnärztlichen Implantologie im Jahr 1982 stiegen die Fallzahlen eingesetzter Zahnimplantate (Hartmann 2009). Mit dem steigenden Einsatz von sowohl zahnärztlichen als auch orthopädischen Implantaten in der Chirurgie nimmt aber auch die Anzahl der Komplikationen zu (Lin et al. 2001, Teller et al. 2007). Besonders Biofilm-assoziierte Implantat-Infekte stellen inzwischen das zentrale Problem dar (Liu et al. 2012).

Funktionalisierungen von Implantatoberflächen können eine Kolonisierung durch Mikroorganismen verhindern. Hierzu wurden unterschiedliche Technologien zur

Veränderung der Implantatoberfläche und die Armierung medizinischer Implantate mit antimikrobiellen Agenzien entwickelt (Lin et al. 2001, Teller et al. 2007).

2.1 Titan als Implantatmaterial

Titan und Titanlegierungen sind weit verbreitete Werkstoffe, die aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften und biologischen Verträglichkeit vorteilhafter sind als nichtrostende Medizinstähle und Metalllegierungen und vor allem als Implantatmaterial für Platten, Schrauben und in Form von Dentalimplantaten Anwendung finden.

In der Medizintechnik werden neben technisch reinem Titan vor allem die Legierungen TiAl6V4 und TiAl6Nb7 eingesetzt (Wintermantel und Ha 2008). Es handelt sich hierbei um Zweiphasenlegierungen mit je 6% Aluminium und 4% Vanadium bzw. 7% Niob.

Die Vorzüge dieser Legierungen ergeben sich aus dem geringen spezifischen Gewicht in Verbindung mit hoher Dauerschwingfestigkeit, einem Elastizitätsmodul nahe dem humanen Knochen und hoher Korrosionsbeständigkeit. In Kontakt mit Sauerstoff bildet sich spontan an der Oberfläche eine passivierende Oxidschicht aus. Diese nur wenige Nanometer dicke Oxidschicht ist in physiologischer Umgebung aufgrund von gebundenen Hydroxylgruppen an den äußeren Atomlagen schwach negativ geladen. Dies begünstigt eine Adsorption von Proteinen aus dem Körperserum und bildet somit die Voraussetzung für die Interaktion von Zellen an der Implantat-Grenzfläche (Brunette et al. 2001).

2.2 Implantat-assoziierte Infektionen

2.2.1 Entstehung des bakteriellen Biofilms

Nach der Implantation eines Biomaterials beginnt der „Wettlauf um die Besiedlung der Oberfläche“ (Gristina et al. 1987a). Hierbei stehen körpereigene Zellen, Bakterien und Makromoleküle in direkter Konkurrenz um die Kolonisation der Implantatoberfläche. Der Ausgang dieses Konkurrenzkampfes entscheidet letztlich über das Schicksal des Implantats (Gristina 1987). Gewinnen körpereigene Zellen die Oberhand, wird das Implantat osseointegriert und eine bakterielle Besiedlung zukünftig erschwert. Andererseits verhindert eine bakterielle Besiedlung das Anwachsen körpereigener Zellen und es kommt zur Periimplantitis (Gristina 1987).

Die adhäsive Kolonisierung der Implantatoberfläche durch Bakterien bildet den initialen Schritt bei der Entstehung des bakteriellen Biofilms (Davey und O'toole 2000, Donlan 2002).

Bereits zum Zeitpunkt der Implantation stellt ein Biomaterial eine für Bakterien besiedlungsbereite Oberfläche dar, an der es sofort zu Wechselwirkungen zwischen der äußeren Atomschicht der Implantatoberfläche und dem biologischen Gewebe kommt.

Jede Oberfläche wird in biologischer Umgebung sofort mit einem aus Proteinen und Glykoproteinen bestehenden „conditioning film“ überzogen (Gristina et al. 1991). Diese Oberfläche sorgt anfänglich aufgrund ihrer negativen anionischen Ladung für die Abstoßung ebenfalls negativ geladener Bakterien (Gristina et al. 1991). In diesem Stadium der bakteriellen Besiedlung sorgen dennoch schwache Wechselwirkungen wie van der Waal's Kräfte und ausreichend lange Kontaktdauer dafür, dass das Biomaterial und die Bakterien irreversible komplexe Vernetzungen über Glykoproteinstrukturen ausbilden können (Gristina et al. 1991).

Nach der primären Vernetzung bewegen sich Bakterien entlang der Oberfläche und bilden Mikrokolonien aus. Proliferation, Formation und Differenzierungsprozesse führen schließlich zur Bildung eines typischen dreidimensionalen Biofilms (Flemming und Wingender 2010).

Biofilme sind räumlich organisierte Kolonien von Mikroorganismen, die mit einem Substrat, einer Oberfläche sowie untereinander adhärent und in eine von ihnen produzierte extrazelluläre, polysaccharidhaltige Matrix eingebettet sind (Sanderink et al. 2008).

In Biofilmen organisierte Bakterien nehmen die Charakteristika mehrzelliger Organismen an und unterscheiden sich deutlich bezüglich Gentranskription und Wachstumsrate von ihren planktonischen Verwandten (Becker et al. 2001).

Mittels chemischer Signalsprache (Quorum-Sensing) können sowohl identische als auch unterschiedliche Bakterienarten im Biofilm untereinander kommunizieren. Dadurch kann die genetische Expression der Keime so geändert werden, dass Genprodukte und das Enzymrepertoire spezifisch auf die Umgebung des Biofilms angepasst werden (de Kievit und Iglewski 2000, Waters und Bassler 2005).

Die bedeutendste Konsequenz der veränderten Genexpression ist die Bildung der extrazellulären Matrix.

Diese als Glycocalix bezeichnete Matrix stellt eine Diffusionsbarriere für antibakterielle Chemotherapeutika sowie für immunologische Abwehrmechanismen dar (Gilbert et al. 2007).

2.2.2 Staphylococcus aureus

Die Fähigkeit an Materialien anzuhafte und einen Biofilm auszubilden, ist ein wichtiger Faktor für die Pathogenität der Mikroorganismen (Cramton et al. 2001).

Die grampositive, fakultativ anaerob wachsende Spezies *S. aureus* gilt als einer der häufigsten Erreger von Implantat-assoziierten Infektionen (Doll et al. 2016).

Zusammen mit *Staphylococcus epidermidis* ist *S. aureus* in über 60% der Fälle an Implantat-assoziierten Infektionen beteiligt (Geipel und Herrmann 2004, Kittinger et al. 2011). Eine wichtige Rolle spielt hierbei das von *S. aureus* produzierte β -1,6-verknüpftes N-acetylglucosamin (PNAG). PNAG führt zur Zell-Zell-Adhäsion und ist notwendig für die Biofilmproduktion (Maira-Litran et al. 2002).

Des Weiteren verfügt *S. aureus* über das Biofilm-assoziierte-Protein (Bap). Bap ist ein Oberflächenprotein, welches im Gegensatz zu PNAG zusätzlich zur Zell-Zell-Adhäsion auch für die Primäradhäsion des Bakteriums an der Oberfläche von Bedeutung ist (Cucarella et al. 2001).

Zusätzlich besitzt *S. aureus* sogenannte MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). MSCRAMM-Proteine sind Oberflächenadhäsine, die mit zahlreichen menschlichen Geweben, Serumproteinen und Polypeptiden der Extrazellulärmatrix interagieren. Diese Interaktionen ermöglichen unter anderem die Adhärenz an Serumproteine, welche die Implantatoberflächen initial nach dem Einbringen in den menschlichen Körper bedecken (Cucarella et al. 2002, Ziegler 2006).

2.3 Antiinfektiöse Oberflächen

Antiinfektiöse Funktionalisierungen von Implantatoberflächen sind aufgrund der oben beschriebenen Problematik der Implantat-assoziierten Infektion schon lange Gegenstand der medizinischen Forschung (Gemeinhardt 2008).

Im Jahr 2015 konnte erstmals durch Romano et al. eine Klassifizierung antiinfektiöser Oberflächen vorgenommen werden. In Abhängigkeit von der Wirkungsstrategie werden antiinfektiöse Oberflächen in drei Gruppen eingeteilt (Romano et al. 2015).

Die erste Gruppe versucht passiv, durch antiadhäsive Funktionalisierung der Oberfläche, das initiale Anheften von Bakterien zu verhindern. Die Adhäsionseigenschaften einer Oberfläche können durch grenzflächenaktive Schichten eingestellt werden.

Beispielsweise bewirkt eine Beschichtung von medizinischen Implantaten mit querverbundenem Albumin eine verminderte Adhärenz von Bakterien (An et al. 1996). Dabei werden jedoch körpereigene Zellen, wie etwa Osteoblasten gleichermaßen abgestoßen wie Bakterien.

Die zweite Gruppe versucht durch perioperative Maßnahmen den Schutz des Implantats zu gewährleisten. Es wird also unmittelbar im zeitlichen Umfeld des chirurgischen Eingriffs das Implantat mit antibakteriellen Carrier-Systemen oder Schichten funktionalisiert. Buchholz und Engelbrecht publizierten erstmals Ergebnisse von einem mit Antibiotika beladenen Polymethylmethacrylat (PMMA) Knochenzement (Buchholz und Engelbrecht 1970).

Die dritte Gruppe verwendet aktive Oberflächenfunktionalisierungen. Dabei wird eine normalerweise inerte Implantatoberfläche durch Integration von antibakteriellen Wirkstoffen wie Antibiotika, Antiseptika oder Schwermetallionen funktionalisiert. Ziel der aktiven Oberflächenfunktionalisierung ist entweder das Abtöten adhärenter Bakterien („contact killing“) oder die bakterielle Suppression durch Wirkstofffreisetzung („drug eluting“) (Romano et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Varianten der aktiven Oberflächenfunktionalisierung untersucht. Im Folgenden wird die Wirkungsweise relevanter antibakterieller Agenzien näher beschrieben.

Eine antibakterielle Wirkung beruht im Allgemeinen auf der Beeinflussung von Zellgrundbestandteilen wie z.B. Proteinen oder durch Eingriff in deren Synthese.

Substanzen, die direkt mit Bakterien wechselwirken und auch auf körpereigene Zellen eine toxische Wirkung entfalten können, sind Antiseptika bzw. Antibiotika.

Antiseptika bewirken eine strukturelle Veränderung von Proteinen und damit die Inaktivierung ihrer spezifischen biologischen Funktion. Die antiseptische Wirkung von Metallionen wie z.B. Silber- oder Zinkionen ist seit mehr als 2000 Jahren bekannt (Lemire et al. 2013).

Beispielsweise wurde Wasser in Silberkrügen transportiert und Wunden mit zinkhaltigen Salben behandelt (Ahrens et al. 2006, Hänle 2008). In den letzten Jahrzehnten gab es eine Vielzahl von Untersuchungen, bei denen Oberflächen mit Silberbestandteilen funktionalisiert wurden.

Harrasser et al. beobachteten eine antibakterielle Potenz von mit silber-funktionalisiertem Polyethylen (Harrasser et al. 2016) in der Wirkung auf *S. aureus* und *S. epidermidis*.

Außerdem findet Silber seit Jahren eine klinische Anwendung in Biomaterialien wie Wundverbänden und Kathetersystemen (Castellano et al. 2007, Gilbert und Harden 2008). Dabei beruht der antibakterielle Effekt von Silber auf verschiedenen Mechanismen.

Jaiswal et al. und Feng et. al zeigten, dass Silberionen mit essentiellen thiol (sulfhydryl)- Gruppen der bakteriellen Enzyme interagieren können und zu deren Inaktivierung führen. Des Weiteren kommt es zu einer Inhibition der DNA-Replikation sowie zu einer Reduktion der ATP-Konzentration im bakteriellen Organismus (Feng et al. 2000, Jaiswal et al. 2010). Ebenso wird von einer strukturellen Schädigung der Zellmembran des Bakteriums durch Interaktion mit Phospholipiden berichtet (Dror-Ehre et al. 2009).

Auch Zink gewann als antibakterielles Agens in medizinischen Produkten in den letzten 10 Jahren mehr und mehr an Bedeutung. Die antibakterielle Potenz gegenüber einem breiten pathogenen Keimspektrum, darunter auch *S. aureus*, wurde in verschiedenen Studien beschrieben (Sawai 2003, Grenho et al. 2015).

Seil et al. untersuchten das Verhalten eines Polymerbiomaterials mit inkorporierten Zinkoxid Nanopartikeln. Nach einer Kultivierung für 24 bzw. 72 Stunden mit dem Testkeim *S. aureus* konnte eine verminderte Biofilmbildung auf den Probekörpern mit den ZnO-Nanopartikeln gegenüber reinem Polymer festgestellt werden (Seil und Webster 2011).

Es wird davon ausgegangen, dass auf zinkhaltigen Oberflächen reaktive Sauerstoffradikale (ROS) wie $^1\text{O}_2$, $\text{HO}\cdot$ oder H_2O_2 entstehen. Diese Sauerstoffradikale können die bakterielle Zellmembran penetrieren und zu DNA-Schädigungen und zur Protein-Oxidation führen (Hu et al. 2012, Huo et al. 2013).

Neben den beschriebenen antiinfektiösen Funktionalisierungen von Implantatoberflächen mit Hilfe von Metallionen können Oberflächen auch mit organischen, antibiotischen Substanzen armiert werden.

Ein weit verbreiteter Vertreter dieser Substanzen ist das Aminoglykosid Gentamicin. Gentamicin wurde erstmals 1963 aus dem Bakterium *Micromonospora purpurea* isoliert. Es wirkt bakterizid auf gram-positive Staphylokokken, wie *S. aureus* und *S. epidermidis*, die Problemkeime der Implantat-assoziierten Frühinfektion (Schiefer et al. 2008).

Der antibakterielle Effekt basiert auf der Inhibition der Proteinbiosynthese durch Inaktivierung der 30s Untereinheit der Ribosomen. Außerdem kann Gentamicin Lipopolysaccharide der Zellwand schädigen und somit eine Zelllyse hervorrufen (Kittinger et al. 2011).

Lucke et al. untersuchten in einem Tierversuch die antibakterielle Wirkung von Titan-Kirschner-Drähten, die mit Gentamicin aufgeladenen Poly (D, L-Laktid) Schichten funktionalisiert wurden. Dabei wurden die Markhöhlen der Tibia von Sprague Dawley Ratten mit *S. aureus* infiziert und anschließend implantiert. Es konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu nicht beschichteten Titan-Kirschner-Drähten antibakteriell funktionalisierte Oberflächen zu einem signifikant verminderten Bakterienwachstum führten (Lucke et al. 2003). Für die Beschichtung bzw. Funktionalisierung von Biomaterialien mit antibakteriell wirksamen Substanzen, insbesondere Silber, Zink und Gentamicin liegen wie oben beschrieben, inzwischen einige Studien vor.

Antibakteriell wirksame Oberflächen weisen aber oft aufgrund der hohen Konzentration von Silber- bzw. Zinkionen eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber den körpereigenen Zellen auf (Zhao et al. 2011).

Gute antibakterielle Eigenschaften werden demzufolge oft mit schlechterer Biokompatibilität erkaufte. Studien der letzten Jahre verfolgten deshalb das Ziel, Beschichtungen mit hoher antibakterieller Aktivität bei möglichst gleichzeitig guten bioaktiven Eigenschaften zu generieren.

Kaifu et al. untersuchten die osteogenetische Aktivität und die antibakteriellen Effekte einer Titanoberfläche, die mit zinkhaltigen Titan-Nanotubes funktionalisiert wurde (Huo et al. 2013).

Mit Silber inkorporierte Nanotubes wurden hinsichtlich Osteoinduktivität und antibakterieller Aktivität von Lingzhou et al. untersucht (Zhao et al. 2011). Durch elektrochemische Anodisierung werden Nanotubes auf die Titan-Implantatoberfläche aufgebracht. Durch die Nanostruktur und Topografie der Oberfläche kann eine verbesserte Osseointegration durch erhöhte Osteoblastenaktivität erzeugt werden. Gleichzeitig dienen die Nanotubes als carrier für die antibakteriellen Agenzien Silber- bzw. Zink (Zhao et al. 2011, Huo et al. 2013).

Außerdem sind Oberflächen-Funktionalisierungen von Titan mit Polyelectrolyt-Schichten aus Hyaluron-Säure/Chitosan (HA/CH PEM) gekoppelt mit surface-immobilized cell-adhesive arginine-glycerine-aspartic acid (RGD) Proteinen bekannt. RGD ist eine aus Adhäsion-Proteinen isolierte Aminosäuresequenz, die nachweislich die Osteoblasten- Differenzierungsaktivität steigert. Chitosan und Hyaluronsäure sind natürlich vorkommende Polysaccharide die das Bakterienwachstum inhibieren können (Chua et al. 2008).

Neben den oben beschriebenen Technologien bietet die plasmachemische Oxidation (PCO) ebenfalls das Potential zur Verbesserung der Osseointegration von Titanimplantaten.

Diefenbeck et al. konnten bereits im Tierversuch bestätigen, dass mittels PCO hergestellte bioaktive TiOB® Oberflächen im Vergleich mit herkömmlichen Titanlegierungen eine verbesserte Osseointegration aufweisen (Diefenbeck et al. 2011).

2.4 Verfahren zur Oberflächenbeschichtung von Titanimplantaten

2.4.1 Plasmachemische Oxidation

Titan verfügt unter atmosphärischen Bedingungen über eine dichte Oberflächen-oxidschicht. Diese kann durch die Prozesse der plasmachemischen Oxidation in ihrer chemischen Zusammensetzung und Morphologie verändert werden. Bei der plasmachemischen Oxidation wird das Substrat (Titan) positiv geschaltet und über ein Elektrolytbad mit der Kathode verbunden.

Das Verfahren beruht auf dem Phänomen der anodischen Oxidation (Wirtz et al. 1991). Die Triebkraft ist das angelegte Potential, welches den Durchtritt von Ionen durch die isolierende Oxidschicht bewirkt. Bei angelegtem Potential erfolgt bei der Titananode an der Grenzfläche Metall/Oxid die Oxidation von Titan (Gleichung 1).

An der Grenzfläche Oxid/Elektrolyt konkurriert die Bildung von Sauerstoff-Ionen (Gleichung 2) mit einer Oxidationsreaktion unter Sauerstoffentwicklung (Gleichung 3). An der Kathode entsteht durch die Reduktion von Wasser gasförmiger Wasserstoff (Gleichung 4).

In Abhängigkeit der Richtung der Feldlinien findet ein gegenläufiger Ladungstransport der gebildeten Titan- und Sauerstoffionen durch die Sperrschicht statt. Das führt zu einem Wachstum der Schicht durch die Bildung von Titanoxid an beiden Grenzflächen. (Gleichung 5).

Tab. 1: Elektrochemische Reaktionen der plasmachemischen Oxidation

$Ti^0 \Leftrightarrow Ti^{4+} + 4e^-$	(1)
$2H_2O \Leftrightarrow 2O^{2-} + 4H^+$	(2)
$2H_2O \Leftrightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$	(3)
$2H_2O + 2e^- \Leftrightarrow H_2 + 2OH^-$	(4)
$Ti^{4+} + 2O^{2-} \Leftrightarrow TiO_2 + 2e^-$	(5)

Durch Funkenentladung an der Anode entstehen in Abhängigkeit vom Elektrolytssystem, dem Anodenmaterial (Titan) und der Stärke des elektrischen Feldes Konversionsschichten keramischen Charakters, die Elektrolytbestandteile beinhalten können (Wirtz et al. 1991).

Dabei ist der Potentialunterschied zwischen Anode und Kathode der entscheidende Faktor für die Dicke der Schicht. In Abhängigkeit vom Beschichtungspotential kann die Schichtbildung in dem dabei verwendeten Elektrolyt in folgende Bereiche differenziert werden: Anodisation im Vorfunkensbereich (ca. <150 V), vereinzelte Funkenentladungen (ca. 200 V) und Plasma induzierter Schichtaufbau (ca. >220 V) (Käßbohrer 2002, Butte 2002).

Eine bioaktive Titanoxidschicht (TiOB®) wird bei einer Spannung von 280 V hergestellt. In den durch plasmachemische Oxidation entstandenen Poren sind Bestandteile des Elektrolyts eingelagert. Für die Erzeugung von bioaktiven TiOB® Oberflächen wird ein calcium- und phosphathaltiges Elektrolyt verwendet.

Das Rauheitsprofil der entstandenen Konversionsschichten mit eingelagertem Calcium und Phosphat aus dem Elektrolyt sind entscheidende Voraussetzungen für eine verbesserte Osseointegration (Schrader et al. 2011).

Zum einen sind für das Einwachsen von Knochen in die Oberflächenstruktur des Implantats Porengrößen < 100 µm erforderlich, zum anderen initiiert der Einbau von Calcium und Phosphat in stöchiometrischem Verhältnis die chemische Zusammensetzung des Knochens und beschleunigt so die Osseointegration (Li et al. 2004).

2.4.2 APCVD Verfahren

Das Verfahren des APCVD (Atmospheric Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition) beschreibt eine Abscheidung von metallischen- oder nichtmetallischen Hartstoffschichten auf einer erhitzten Substratoberfläche durch chemische Reaktion in der Gasphase bei Temperaturen von 500-700 °C unter dem Atmosphärendruck von 4-6 Bar. Bei diesem plasmagestützten Verfahren kann die aufzubringende Schichtsubstanz sowohl direkt verdampft bzw. zerstäubt als auch durch reaktives Verdampfen abgeschieden werden (Abb. 2).

Dabei reagiert zunächst eine Vorstufe des abzuscheidenden Stoffes in der umgebenden Gasatmosphäre in einem Niederdruck-Kalt-Plasma mit Sauerstoff zum eigentlichen Beschichtungswerkstoff und wird anschließend am Substrat kondensiert (Beier et al. 2013, Wiegand et al. 2014, Beier et al. 2015).

2.4.3 Dip Coating

Mit dem Dip-Coating-Verfahren können dünne Schichten komplexer Substrate durch Tauchen in eine kolloide Suspension erzeugt werden. Auf dem Probekörper scheidet sich dabei zunächst ein dünner Film ab, dessen flüchtige Bestandteile verdampfen.

Mit einer thermischen Nachbehandlung können aus dem gebildeten Gelfilm restliche Substanzen des Lösungsmittels entfernt werden. Für einen reproduzierbaren

Beschichtungsprozess muss neben einer konstanten Tauchgeschwindigkeit auch auf eine homogene Konzentration der Tauchlösung geachtet werden.

Die entstehenden Schichtdicken auf dem Probekörper sind dabei abhängig von der Tauchgeschwindigkeit und der Viskosität der Tauchlösung (Brinker 2013).

3 Ziele der Arbeit

Titanimplantate, die zum einen verbesserte osteoinduktive Eigenschaften besitzen und zum anderen eine antibakterielle Aktivität aufweisen, könnten dazu beitragen, die Implantat-assoziierte Infektionsrate zu senken und die Fixation im Knochen zu verbessern.

Wie die aktuelle Literatur zeigt, gibt es viele Ansätze zur Optimierung der Oberflächenbeschaffenheit von Titanimplantaten hinsichtlich Verbesserung der Biokompatibilität und der antiinfektiösen Eigenschaften.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob bioaktive TiOB® Oberflächen mit den antiinfektiösen Agenzien Gentamicin, Silber oder Zink funktionalisiert werden können und ein antibakterieller Effekt bei gleichzeitig guter Biokompatibilität nachweisbar ist.

Folgende Zielstellungen wurden verfolgt:

- (1) Herstellung einer antibakteriell funktionalisierten TiOB® Oberfläche durch unterschiedliche Verfahren
- (2) Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der antibakteriellen Effektivität funktionalisierter TiOB® Oberflächen
- (3) Ermittlung der Freisetzungskinetik der antibakteriellen Substanzen aus den Testoberflächen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Expositionszeiten im Testmedium
- (4) Beurteilung der Proliferationsfähigkeit exponierter Bakterien, als Maß der antibakteriellen Effektivität, auf den funktionalisierten Testoberflächen
- (5) Bestimmung des zytotoxischen Einflusses der Testoberflächen auf exponierte MC3T3 Osteoblasten

4 Methodik

4.1 Probekörper

Die Herstellung der Grundformen der verwendeten Probekörper aus der Titanlegierung Ti6Al4V (DIN ISO 5832-3) erfolgte durch die Firma Königsee Implantate GmbH, Aschau, Deutschland. Für die Untersuchungen standen zwei Probekörper-Geometrien zur Verfügung.

Die mikrobiologischen Tests erfolgten an zylindrischen Stiften (aktive Fläche: 12 mm lang, 1,5 mm Durchmesser, Stückzahl: 56, 8 pro Oberflächenvariante) und der Zytotoxizitätstest an scheibenförmigen Probekörper (2 mm Dicke, 15 mm Durchmesser, Stückzahl: 6 pro Oberflächenvariante) (Abb. 1a, b).

Die Probekörper wurden von der Rösler Oberflächentechnik GmbH mit Korundperlen vorgestrahlt und anschließend mit 120 µm großen Keramik Partikeln geschliffen.

Die Grundbeschichtungen der Titan-Probekörper mit der patentierten TiOB® Oberfläche übernahm die Firma INNOVENT Technologie-Entwicklung e.V. Jena, Deutschland mittels plasmachemischer Oxidation (PCO) (Abb. 1c).

Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Diefenbeck et al. 2011, Schrader et al. 2012), beruht das Verfahren der PCO auf der anodischen Oxidation. Dabei wird in Abhängigkeit vom Elektrolytsystem, dem Anodenmaterial und den Strom- und Spannungsverläufen die natürliche Oxidationsschicht des Titans in Zusammensetzung und Morphologie verändert.

Die Untersuchungen der Probekörper erfolgten mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (ZEISS Supra 55 VP, Carl-Zeiss GmbH, Jena, Deutschland). Nach Gold-Sputtering wurde die Beschleunigungsspannung auf 5 kV erhöht und ein SE2-Detektor für die Bilderfassung verwendet.

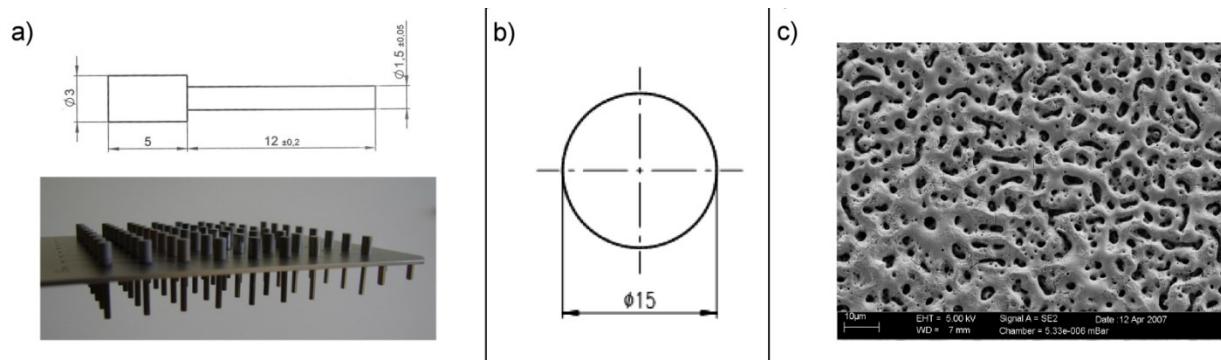


Abb. 1: a) TiOB® Probekörper Stiftformat $\varnothing = 1,5$ mm, Länge = 12 mm, 96-Loch Probenhalter
b) TiOB® Probekörper rund $\varnothing = 15$ mm, Dicke 2 mm c) REM Aufnahme der bioaktiven TiOB® Schicht (280 V) (Zeiss Supra 55 VP, Carl-Zeiss GmbH, Jena, Deutschland)

4.2 Funktionalisierung der TiOB® Oberflächen mit antibakteriellen Wirkstoffen

4.2.1 Oberflächenfunktionalisierung mit Tannin/Gentamicin

Die Funktionalisierung der TiOB® Oberflächen erfolgte ebenfalls durch die Institution INNOVENT Technologieentwicklung e.V., Jena, Deutschland.

Als Trägermaterial für den Wirkstoff Gentamicin wurde das hydrolysierbare Polyhydroxyphenol Tannin in pharmazeutischer Reinheit (Ph. Eur.) verwendet. Durch die Neutralisation des sauren Gentamicin- $2\text{H}_2\text{SO}_4$ mittels NaOH werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gentamicin und Tannin ermöglicht, die dazu führen, dass ein Tannin/Gentamicin-Komplex ausfällt. 500 mg dieses Tannin/Gentamicin-Komplexes wurden in Ameisensäure (Ph. Eur.) gelöst und anschließend in einem Dip Coating Verfahren auf die TiOB® Probekörper aufgebracht, so dass bezogen auf den Wirkstoff, 5 mg pro Probekörper abgeschieden werden.

Die Probekörper wurden zur Verflüchtigung des Lösungsmittels getrocknet. Es bildete sich dabei eine bräunlich-kristalline Tannin/Gentamicin-Schicht auf den Probekörperoberflächen aus.

4.2.2 Oberflächenfunktionalisierung mit SiOx Ag

Die Funktionalisierung der TiOB® Probekörper mit Silbernanopartikeln, eingebettet in einer Siliziummatrix, erfolgte mit Hilfe eines von Beier et al. beschriebenen Verfahrens der APCVD (Beier et al. 2013). Diese Methodik beschreibt eine Abscheidung von

metallischen- oder nichtmetallischen Hartstoffschichten auf einer erhitzten Substratoberfläche durch chemische Reaktionen in der Gasphase bei Temperaturen von 500-700 °C unter einem Atmosphärendruck von 4-6 Bar.

Der experimentelle Grundaufbau des Abscheidungssystems ist in Abb. 2 dargestellt. Ein BLASTER MEF System (TIGRES, Rellingen, Deutschland) dient dem Beschichtungssystem durch Erzeugung eines Plasmas für die Energiezufuhr. Über Sprühhvorrichtungen werden Prozessgas (wasserfreie Luft) und verdampftes Hexamethyldisiloxan (HMDSO) in ein zwischen zwei Elektroden gezündetes niedrig Druck Kalt-Plasma eingebracht.

Die Gasmoleküle werden im Plasma ionisiert und in angeregte Zustände überführt. Dabei entsteht durch Kollision von HMDSO Molekülen mit Prozessgasmolekülen und der Reaktion mit im Prozessgas enthaltenem Sauerstoff Siliziumoxid (SiOx), welches sich auf der Substratoberfläche (TiOB®) abscheidet.

Über eine weitere Sprühhvorrichtung wird eine 5 %ige Silbernitratlösung (Reinheitsgrad: 99,8 %, Merck, Darmstadt, Deutschland) in das Plasma eingebracht. Dabei werden Silbernanopartikel generiert und in die wachsende SiOx-Schicht einlagert. Bei diesem Verfahren können abhängig von der Anzahl der Abscheidungsdurchläufe (25 nm pro Durchlauf) Schichtdicken von 50-200 nm hergestellt werden.

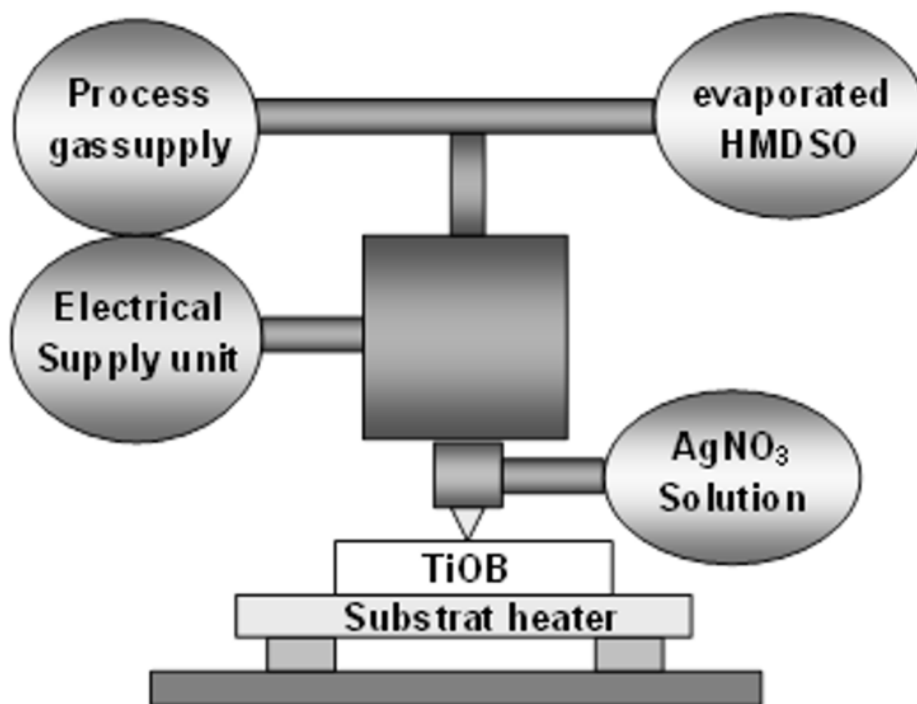


Abb. 2: Experimenteller Grundaufbau des Abscheidungsverfahrens APCVD

4.2.3 Oberflächenfunktionalisierung mit Zink

Die Herstellung der mit Zinkionen funktionalisierten Probekörper erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden plasmachemischen Oxidationsprozessen.

Nach einer TiOB® Vorbeschichtung im Calciumphosphatelektrolyt bis zu einer Beschichtungsendspannung von 200 V wurden die Probekörper dem ersten Elektrolytbad entnommen, mit entionisiertem Wasser gespült und unter Druckluft getrocknet. Die Sekundärbeschichtung zur Einlagerung von Zinkionen erfolgte in einem zinkhaltigen Folgeelektrolyt. Dieser Elektrolyt enthält 0,14 mmol/l Ammoniumhydrogenphosphat, 13,4 mmol Ammoniaklösung (25%) und mit Hilfe von Komplexbildnern stabilisierte Zink-Ionen ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$) in einer Konzentration von 0,5 mmol/l.

Bei einer Endspannung von bis zu 350 V werden Zink-Ionen während der zweiten PCO in die Oberfläche eingelagert.

4.3 Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS)

Mit Hilfe der oberflächensensitiven XPS konnte nachgewiesen werden, ob Zink- oder Silberbestandteile durch den Herstellungsprozess in die Oberfläche eingebracht wurden. Die Detektionstiefe einer XPS Messung betrug ca. 10 nm.

Durch lokales Sputtern der Oberfläche mit einem Ionenstrahl und sukzessiver Messung konnte eine Tiefenprofilanalyse durchgeführt werden. Das verwendete Spektrometer war ein Theta Probe (Thermo VG Scientific) mit monochromatischer Al K α Strahlung (1486.6 eV).

Die Messungen erfolgten bei 10^{-9} - 10^{-8} mbar. Die Anregung (100 W) traten bei einer Spannung von 15 kV und einem Emissionsstrom von 6,7 mA in einer Rasterfläche von 400 μm im Durchmesser in Kraft. Das Spektrometer ist mit einer Ionenkanone ausgestattet. Das Sputtern wurde mit Argon bei ca. $1,5 \times 10^{-7}$ mbar durchgeführt.

Die entstandenen Ionen wurden dann in einer Driftstrecke auf 3 keV bei einem Ionenstrom von ca. 1 μA beschleunigt. Der Fokus des Ionenstrahls betrug 4 μm^2 und führte bei einer Sputterausbeute von 1,39 zu einem Ti-Abtrag von ca. 0,1 nm/s. Beim Sputtern von isolierenden Probekörpern wurde zusätzlich eine Elektronenkanone verwendet, um die elektrostatische Aufladung während des Sputterns und des Messens zu verhindern.

Dazu wurden Elektronen mit 6 eV und 15 μ A auf die Probekörper beschleunigt. Die Kalibrierung der Energieachse vor der Auswertung eines Spektrums erfolgte anhand des O1s Peaks (EB(O 1s) = 531,0 eV). Die quantitative Analyse wurde anhand der Peakflächen vorgenommen.

4.4 Experimentelle Gruppen

Für die anschließenden *in-vitro* Tests erfolgte die Einteilung der Probekörper in vier experimentelle Gruppen (Tab. 2). Alle Probekörper wurden vor ihrer Verwendung durch Autoklavierung (35 min bei 134-138 °C und $2.16 \cdot 10^5$ Pa) sterilisiert.

Tab. 2: Experimentelle Testgruppen mit entsprechender Oberflächenfunktionalisierung und Kontrollgruppe ohne Funktionalisierung

Testgruppen/Kontrollgruppe	Oberflächenfunktionalisierung
TiOB [®] Tannin/Gentamicin	Ti6Al4V, PCO (280 V) TiOB [®] Vorbeschichtung, Dip Coating
TiOB [®] SiOx Ag	Ti6Al4V, PCO (280 V) TiOB [®] Vorbeschichtung, APCVD
TiOB [®] Zn	Ti6Al4V, 1. PCO (200 V) TiOB [®] Vorbeschichtung, 2. PCO (350 V) Sekundär- beschichtung im Zinkelektrolyt
TiOB [®] Kontrollgruppe	Ti6Al4V, PCO (280 V) TiOB [®] Beschichtung

4.5 Mikrobiologische Tests

Als mikrobiologische Testspezies wurde *S. aureus* subs. Rosenbach (ATCC 49230) verwendet. Das Bakterium wurde auf TS-Agar (Tryptose-Soja-Agar, Fa. Oxoid, Germany) bei 37 °C aerob kultiviert. Für die Testansätze konnten jeweils frisch zwei bis drei Kolonien entnommen und anschließend in TS-Broth (Tryptose-Soja-Broth, Fa. Oxoid) überführt und für ca. 4 h bei 37 °C kultiviert werden.

Bei allen Untersuchungen kamen Bakteriensuspensionen aus einer exponentiellen Wachstumsphase zum Einsatz.

4.5.1 Agardiffusionstest/ Freisetzungskinetik

Mittels Agardiffusionstest sollte die Freisetzungskinetik der antibakteriellen Agenzien aus den Testoberflächen untersucht werden. Für diesen Test standen pro Oberflächenfunktionalisierung und Zeitpunkt 8 zylindrische Probekörper zur Verfügung, die in speziellen Probenhaltern im Mikrotiterplattenformat platziert werden konnten (Abb. 1a).

Die Probekörper wurden zunächst über verschiedene Zeiträume (2, 4, 6, 12, 24, 48 h) bei 37 °C in sterilen 96-Lochplatten gelagert und mit jeweils 300 µl PBS als Eluationsmedium überschichtet.

Nach den jeweiligen Expositionszeiten konnten die entstandenen Eluate vollständig gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt werden.

Für den Agardiffusionstest wurde ein TS-Agar mit einer proliferierenden *S. aureus* Kultur supplementiert und in Petrischalen vergossen. Die gewonnenen Eluate konnten zu je 100 µl pro Probekörper in ausgestanzte Löcher (Ø= 9 mm) auf diesen Agar überführt werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C erfolgte die Analyse entsprechenden Inhibitionszonen.

4.5.2 Proliferationstest

Ein geeignetes Verfahren zum Testen antibiotischer und antimikrobiell wirksamer Oberflächen stellt der Proliferationstest dar. Um die Langzeitstabilität und die biologische Alterung der Implantatbeschichtung bei vorangegangener Exposition in flüssigem Testmedium zu untersuchen, wurde neben einem statischen, ein dynamischer Versuchsdurchlauf nach Bechert et al. generiert (Bechert et al. 2000). Für diese Untersuchung wurden die bereits in den vorangegangenen Freisetzungstest in PBS exponierten Probekörper (2, 4, 6, 12, 24, 48 h) verwendet.

Um die initiale antibiotische Wirkung der funktionalisierten Oberflächen zu verifizieren, wurden 8 nicht exponierte Probekörper verwendet.

Alle Probekörper konnten mittels des speziell angefertigten Probenhalters (Abb. 1a) auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte positioniert werden. Für eine Stunde erfolgte die Inkubation der Probekörper mit jeweils 300 µl/well einer proliferierenden *S. aureus* Kultur (OD₅₄₆ 0,5, 37 °C) unter leichtem Schütteln (Abb. 3a).

Im Anschluss wurde durch zweimaliges Waschen in PBS (Abb. 3b) die lose an den Testoberflächen adhärierenden Bakterienzellen entfernt und die Probekörper in je

300 µl/well Nährstoff reduziertes Medium (PBS, 1 % sterile TS-Broth, 0.25 % Glucose, 0.2 % (NH₄)₂SO₄) für weitere 18 Stunden überführt (Abb. 3c).

Während dieser Inkubationszeit konnten sich nur vitale adhärenente Bakterien teilen und Tochterzellen in das Medium freisetzen. Diese Tochterzellen waren den unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen der Probekörper ausgesetzt.

Nach der Inkubationszeit wurden die Testmaterialien entfernt und das Medium wurde im Verhältnis 1:3 mit Nährmedium (TS-Broth) versetzt und für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert (Abb. 3c). Die Proliferationsfähigkeit der exponierten Bakterien konnte nun in dieser Phase durch Messung der optischen Dichte (OD₅₄₆) in einem festgelegten Zeitraster (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 24 h) analysiert werden.

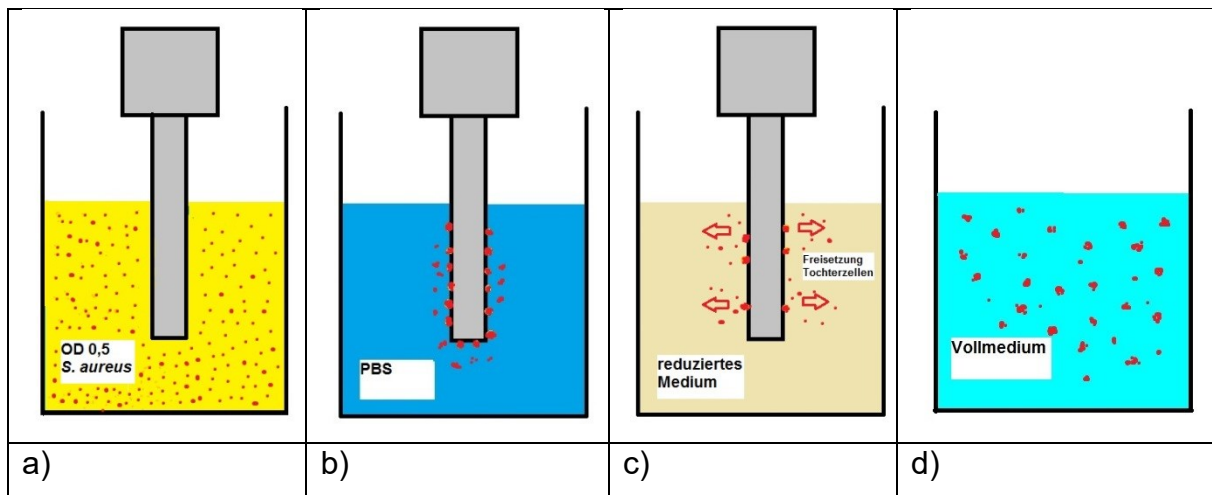


Abb. 3: Schematische Darstellung des Proliferationstests

- a) Inkubation der in PBS exponierten Probekörper für 1 h bei 37 °C in *S. aureus* Suspension
- b) Zweimaliges Waschen der Probekörper in PBS
- c) Inkubation der gewaschenen Probekörper in reduziertem Medium für 18 h bei 37 °C, Freisetzung von Tochterzellen
- d) Entfernung der Probekörper; Inkubation im Vollmedium für 24 h bei 37°C; anschließend Messung der optischen Dichte im festgelegten Zeitraster (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 24 h)

4.5.3 Zytotoxizitätstest

Zellkultur: Für den Zytotoxizitätstest wurde die Maus-Osteoblasten Zelllinie MC3T3-E1 (DSMZ ACC 210) in α-MEM (Minimal Essential Medium), mit 10 % FBS (fötales bovines Serum) und 1 % PenStrep (Penicillin-Streptomycin) (GIBCO; Karlsruhe, Deutschland) bei 37 °C mit 5 % CO₂ kultiviert.

Mittels live/dead assay mit FDA (5 mg/ml Fluoresceine Diacetate, Serva-Electrophoresis, Deutschland) und EtBr (1 mg/ml Ethidium Bromide, SIGMA Aldrich, Deutschland) wurde die Zytotoxizität der funktionalisierten TiOB® Oberflächen gegenüber MC3T3 Zellen untersucht.

Die Applikation der scheibenförmigen Probekörper erfolgte in 12-Lochplatten und konnte anschließend bei einer Zelldichte von 4.500 Zellen/cm² in 2 ml α -MEM (37 °C, 5 % CO₂) für 2 bzw. 4 Tage inkubiert werden.

Nach der Inkubationszeit wurden die Probekörper zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und mit einer frisch angesetzten Färbelösung (12 μ l FDA / 16 μ l EtBr in 2 ml PBS) überschichtet. In der mikroskopischen Auswertung der Probekörper (Nikon, Labophot, Japan, 10 x phase-contrast objektive, λ_{ex} = 455-495 nm) konnte aufgrund der Fluoreszenz zwischen vitalen (FDA-grün) und avitalen (EtBr-rot) Zellen differenziert werden. Pro Probekörper wurden jeweils 9 Gesichtsfelder hinsichtlich vitaler/avitaler Zellen ausgewertet. Je Oberflächenvariante dienten drei Wiederholungen der Datenerhebung.

4.6 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 19.0 für Windows. Die Signifikanz im Proliferationsassay wurde mit Hilfe des *one-way ANOVA* getestet und die Bonferoni-Korrektur diente der Neutralisierung der Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen. Die Unterschiede der gemessenen Daten sind signifikant bei einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$.

Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests konnten mit Hilfe von *boxplots* grafisch dargestellt werden. Der t-test diente der Überprüfung signifikanter Unterschiede der Zellzahl.

5 Ergebnisse

5.1 Probekörper

Auf den Probekörpern, die mit Hilfe des Dip-Coating-Verfahrens mit dem Tannin/Gentamicin Komplex funktionalisiert wurden, bildete sich eine bräunlich-kristalline Tannin/Gentamicin Schicht aus. Diese enthielt den antibiotischen Wirkstoff mit etwa 5 mg pro Probekörper.

Die Herstellung der TiOB[®] SiO_x Ag Probekörper erfolgte mit Hilfe des APCVD Verfahrens. Dabei wurden Schichtdicken von ca. 100 nm SiO_x Ag generiert. Die XPS Messergebnisse ergaben einen Gehalt von ca. 5 At.-% Silber, welches in der Siliziumoxidmatrix inkorporiert ist (Abb. 4a).

Die Herstellung der TiOB[®] Zn Probekörper erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden plasmachemischen Oxidationsschritten. Dabei wurde eine 13 µm dicke TiOB[®] Schichtmatrix erzeugt, die vor allem in den oberen Atomlagen Zinkagglomeration in den Plasmakanälen aufwies (Abb. 5).

Die XPS Messungen ergaben einen Anteil von ca. 20 At.-% Zink bis zu einer Schichttiefe von einem Nanometer. In 160 nm Schichttiefe wurde noch ein Anteil von ca. 7 At.-% Zink beobachtet (Abb. 4b).

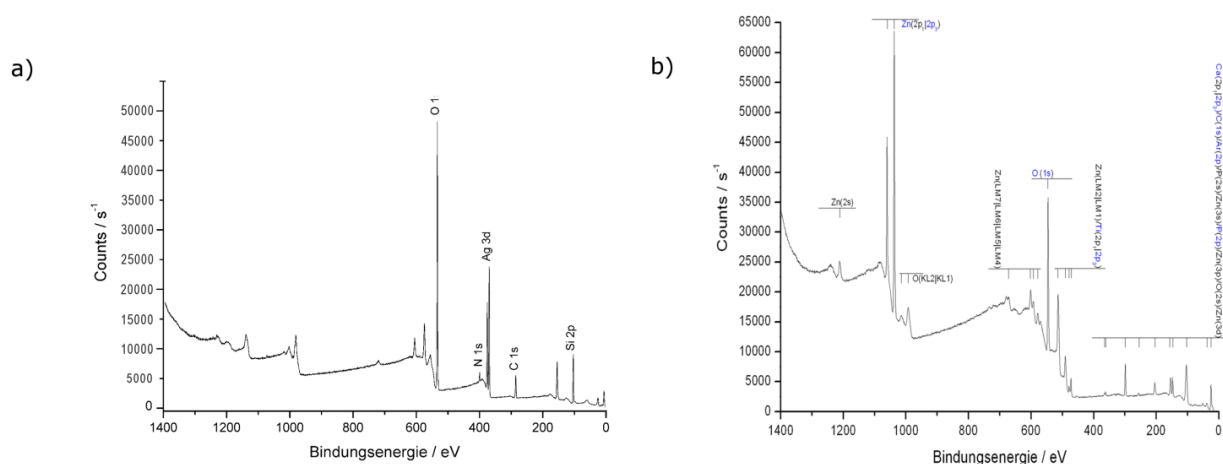


Abb. 4: a) XPS Spektren von TiOB[®] SiO_x Ag Probekörper, b) XPS Spektren von TiOB[®] Zn Probekörper

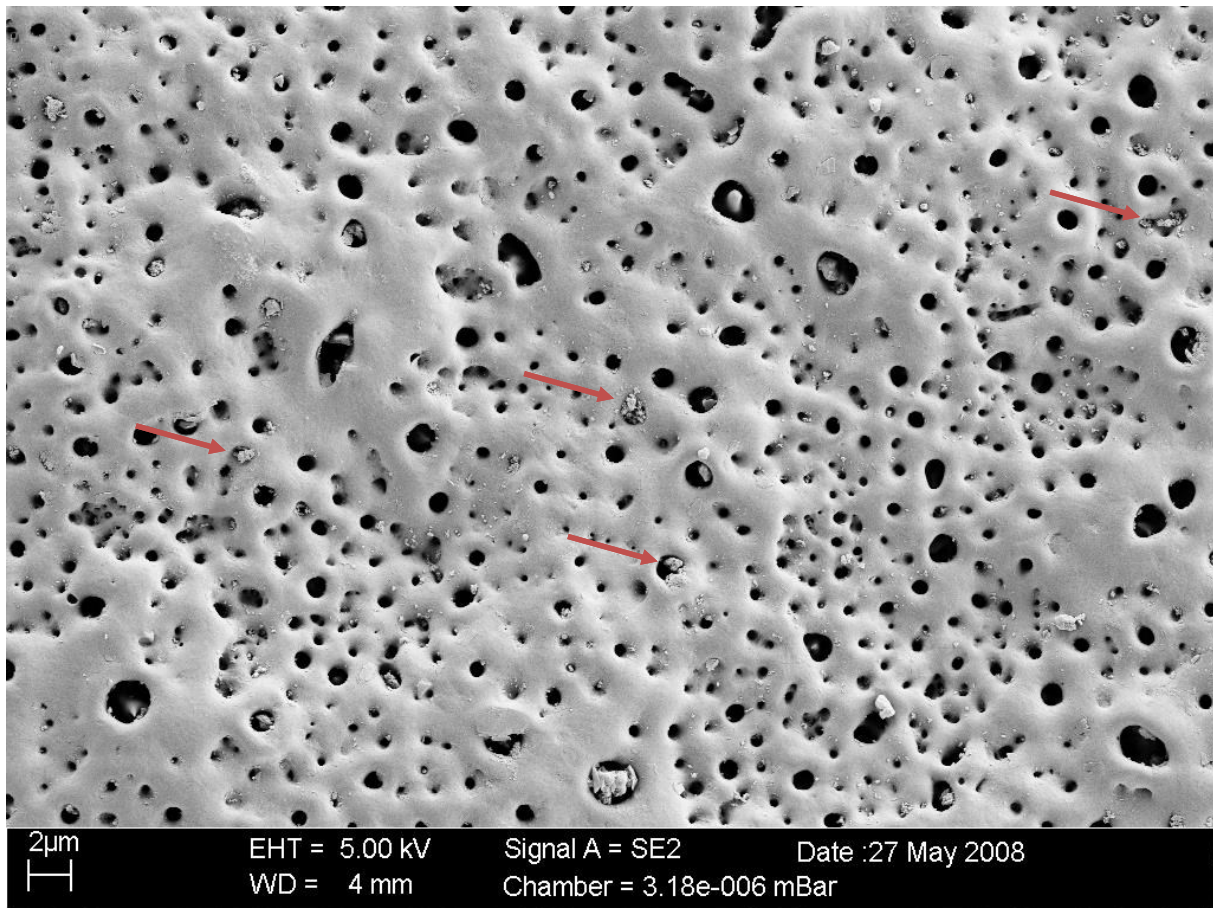


Abb. 5: REM Aufnahme einer TiOB® Zn Oberfläche, in den 1 µm bis 2 µm großen homogen verteilten Plasmakanälen sind feine Zink-Agglomerationen (Pfeilmarkierungen) zu erkennen

5.2 Mikrobiologische Tests

Die Wirkstofffreisetzung der untersuchten Oberflächen wurde im Agardiffusionstest analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Eluate der TiOB® Tannin/ Gentamicin Oberflächen Inhibitionszonen bildeten (Abb. 6). Diese funktionalisierten Oberflächen waren in der Lage, über den gesamten Beobachtungszeitraum (bis 48 h) eine bakterieninhibierende Wirkstoffkonzentration freizusetzen. Dabei waren zu Beginn der Beobachtungszeit die größten Inhibitionszonen nachweisbar.

Im Gegensatz dazu, konnten für die Eluate der Silber- und Zink-Beschichtungen bzw. der TiOB® Kontrolle (Abb. 6) im Agardiffusionstest keine Inhibitionszonen ermittelt werden.

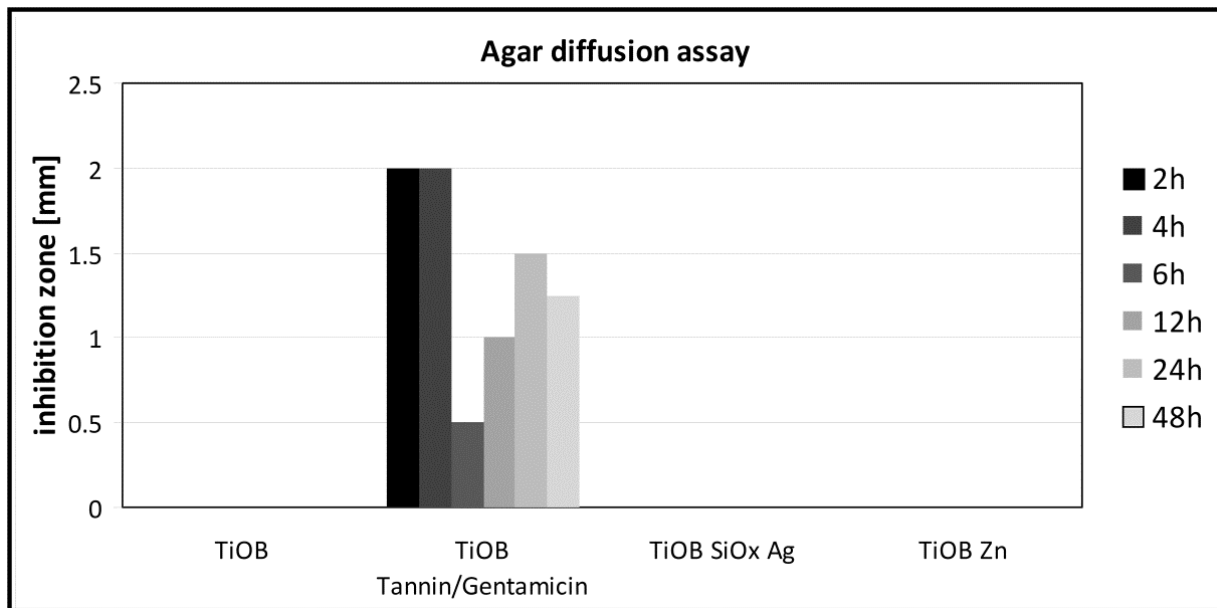


Abb. 6: Inhibitionszonen im Agardiffusionstest der funktionalisierten TiOB[®] Oberflächen mit Eluaten aus zeitabhängiger Exposition der Probekörper in PBS

Im Proliferationstest wurde der Einfluss der funktionalisierten Oberflächen auf das bakterielle Wachstum der Testspezies *S. aureus* untersucht. Als bakterielles Wachstum bezeichnet man die Vermehrung der Bakterien durch Zellteilung.

In einer statischen Bakterienkultur kann das Bakterienwachstum in vier Phasen eingeteilt werden: Latenzphase (lag), exponentielle Phase (log), stationäre Phase und Absterbephase (Abb. 7). In der Latenzphase passt sich der Stoffwechsel der Bakterien an die Bedingungen des umgebenden Nährmediums an. Anschließend geht die Bakterienkultur in ein exponentielles Wachstum über.

Nach Erreichen der Kapazitätsgrenze des zur Verfügung stehenden Raumes und der Nährstoffe stagniert das Bakterienwachstum und ein dynamisches Gleichgewicht zwischen absterbenden und neu hinzukommenden Zellen stellt sich ein. Wird der Toleranzwert der Populationsdichte überschritten und die im Nährmedium zur Verfügung stehenden Nährstoffe sind aufgebraucht, setzt das Absterben der Bakterien ein (Abb. 7).

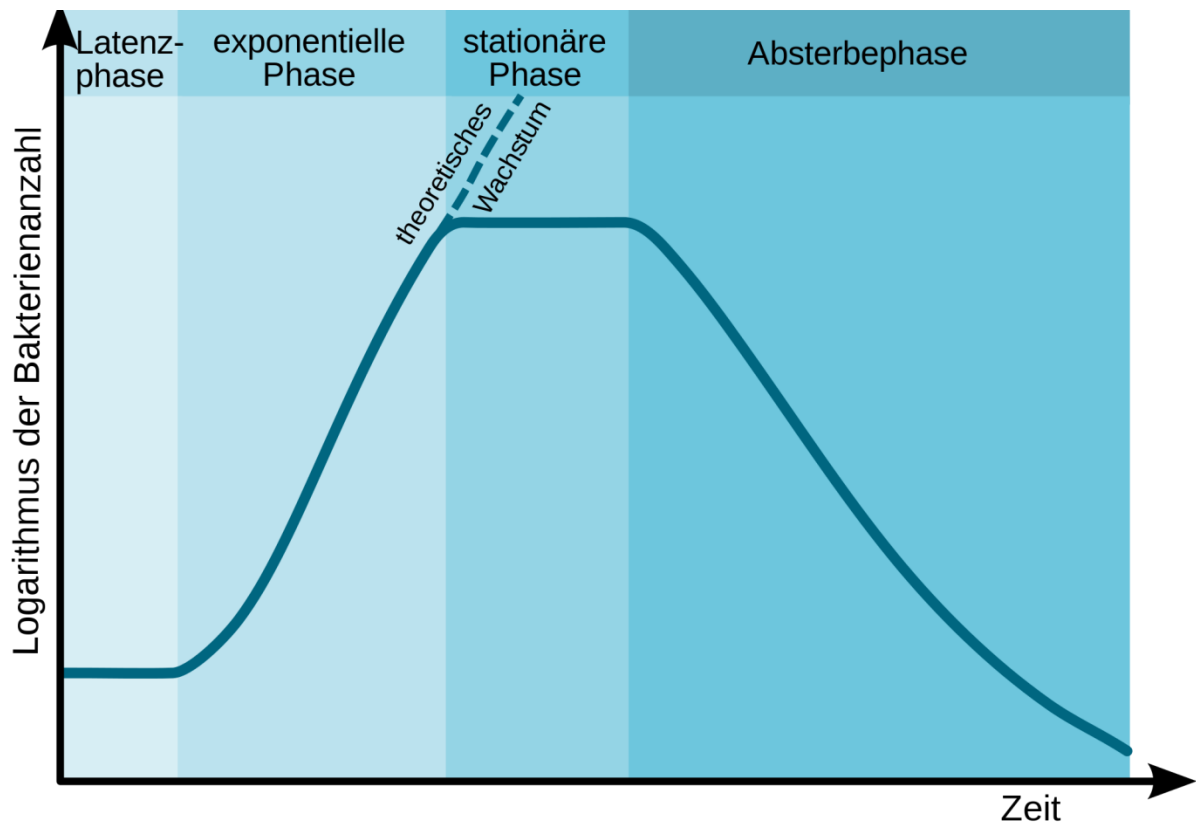


Abb. 7: Ideale Wachstumskurve einer statischen Bakterienkultur (Komorniczak 2009)

In der vorliegenden Studie konnte dieser typische Verlauf der Wachstumskurve einer statischen Bakterienkultur im Proliferationstest bei den TiOB® Kontrollgruppen beobachtet werden.

Die Beurteilung des antibakteriellen Effekts der untersuchten funktionalisierten Oberflächen wurde anhand der Wachstumskurven durch eine verlängerte Latenzphase bewertet. Das verzögerte Bakterienwachstum resultierte auch in einer geringeren Bakteriendichte nach dem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Probekörper aller untersuchten funktionalisierten Oberflächen zu einer Vitalitätseinschränkung von *S. aureus* führten (Abb. 8).

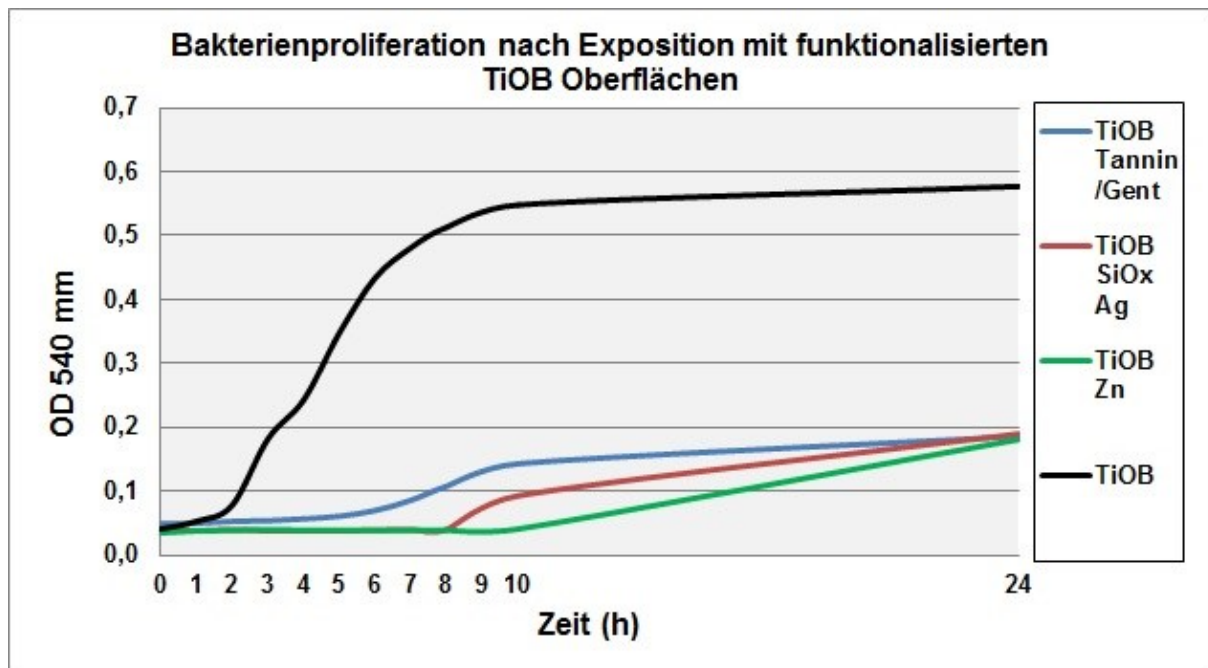


Abb. 8: Bakterielle Wachstumskurven von *S. aureus* nach Exposition gegenüber TiOB® Tannin/Gentamicin, TiOB® SiOx Ag, TiOB® Zn ohne vorangegangene Präinkubation in PBS

Es konnte für alle funktionalisierten Oberflächen eine große initiale antibiotische Wirkung auf die Testspezies beobachtet werden. Die Proliferationskurven zeigten für diese Oberflächen eine signifikant verlängerte Latenzphase (TiOB® Tannin/Gentamicin: 5 h, TiOB® SiOx Ag: 8 h, TiOB® Zn: 10 h) gegenüber der TiOB® Kontrolle ($p < 0.05$) (Abb. 8).

Die unbehandelten TiOB® Kontrolloberflächen wiesen dagegen eine kurze Latenzphase mit einer anschließend schnell ansteigenden exponentiellen Wachstumsphase auf. Für die TiOB® Tannin/Gentamicin und für die TiOB® Zn Oberflächen konnte auch nach maximaler Freisetzungszeit (48 h Lagerung in PBS) gegenüber der TiOB® Kontrolle noch ein signifikanter wachstumshemmender Effekt auf die Testspezies ermittelt werden ($p < 0.05$) (Abb. 9a, c).

Die Probekörper der TiOB® SiOx Ag Oberflächen wiesen nur nach kurzen Expositionszeiten 0 und 4 h ein signifikant vermindertes Bakterienwachstum im Vergleich zu den TiOB® Kontrolloberflächen auf (Abb. 9b).

Die antibakterielle Aktivität aller untersuchten Oberflächen zeigte deutlich eine Abhängigkeit von der zuvor induzierten Freisetzung des Wirkstoffes in PBS.

Die im Proliferationstest nach 24 h gemessenen Bakteriendichten sprechen für eine verminderte antibakterielle Aktivität nach vorangegangener Exposition der Probekörper in PBS (Ausnahme TiOB® SiOx Ag 48 h, 12 h, 6 h). Demzufolge resultieren aus längeren Freisetzezeiten höhere Bakteriendichten nach 24 h.

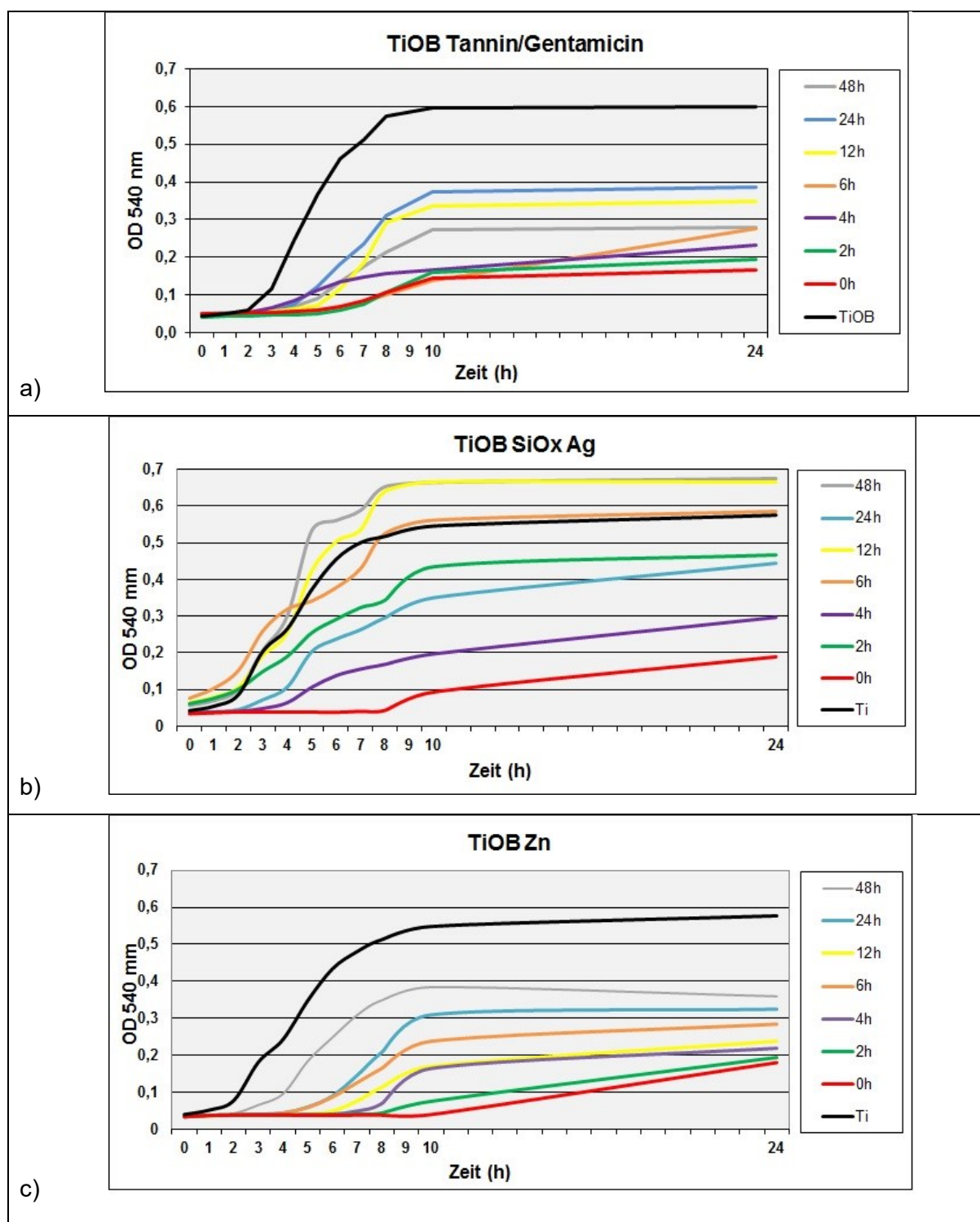


Abb. 9: Proliferation von *S. aureus* nach Exposition mit den funktionalisierten TiOB® Oberflächen nach induzierter Wirkstofffreisetzung durch vorangegangene Lagerung in PBS;
a) signifikante Reduktion des *S. aureus* Wachstums durch TiOB® Tannin/Gentamicin-Funktionalisierung (0 – 48 h) gegenüber der TiOB® Kontrollgruppe *($p < 0.05$)
b) signifikante Reduktion des *S. aureus* Wachstums durch TiOB® SiOx Ag (0, 2, 4 h) gegenüber der TiOB® Kontrollgruppe *($p < 0.05$)
c) signifikante Reduktion des *S. aureus* Wachstums durch TiOB® Zn (0 – 48 h) gegenüber der TiOB® Kontrollgruppe *($p < 0.05$)

5.3 Zytotoxizitätstest

Die untersuchten Oberflächen der Probekörper konnten durchgängig mit MC3T3 Zellen besiedelt werden. Allerdings wurden unterschiedliche Zelldichten auf den einzelnen Oberflächen beobachtet.

Nach zwei Tagen Inkubationszeit wies die TiOB[®] Kontrollgruppe die größte Zahl vitaler Zellen auf (Abb. 10a, 11). Der Anteil avitaler Zellen auf den Probekörpern der Kontrollgruppe lag bei ca. 10% der Gesamtzellzahl und ist damit im Normalbereich.

Bei den funktionalisierten TiOB[®] Oberflächen war nach zwei Inkubationstagen auf den TiOB[®] SiOx Ag Probekörpern die größte Zahl an vitalen Zellen bei annähernd gleichem Anteil avitaler Zellen zu beobachten (Abb. 10a). Die vitalen Zellen auf diesen Oberflächen hatten eine typische flach ausgestreckte Form (Abb. 11).

Auf den Probekörpern mit TiOB[®] Tannin/Gentamicin und TiOB[®] Zn Funktionalisierung konnte nach zwei Inkubationstagen eine geringere Zelldichte als auf den anderen Oberflächen ermittelt werden (Abb. 10a). Die grün fluoreszierenden Zellen fielen zu diesem Zeitpunkt häufig durch eine runde, kugelige Form auf (Abb. 11).

Nach vier Tagen Inkubationszeit wies die Kontrollgruppe erwartungsgemäß einen dichten Zellrasen vitaler MC3T3 Zellen im Vergleich zu den antibakteriell funktionalisierten Testoberflächen auf. Allerdings konnte auch für alle funktionalisierten Oberflächen eine Zunahme an vitalen Zellen festgestellt werden (Abb. 10b, 11).

Für die TiOB[®] Tannin/Gentamicin Probekörper war ein Anstieg des Anteils vitaler Zellen zu beobachten, die aber immer noch im Vergleich zur Kontrollgruppe eine runde, kugelige Form aufwiesen. (Abb. 10b, 11).

Die TiOB[®] Zn und TiOB[®] SiOx Ag Probekörper zeigten insgesamt eine signifikante Zunahme an vitalen Zellen ($p < 0.05$) bei annähernd gleichbleibendem Anteil an avitalen Zellen (Abb. 10b). Die Zellmorphologie zeigte auf diesen Oberflächen zu diesem Zeitpunkt typische, flach ausgestreckte Zellgeometrien wie auf den Oberflächen der Kontrollgruppe (Abb. 11).

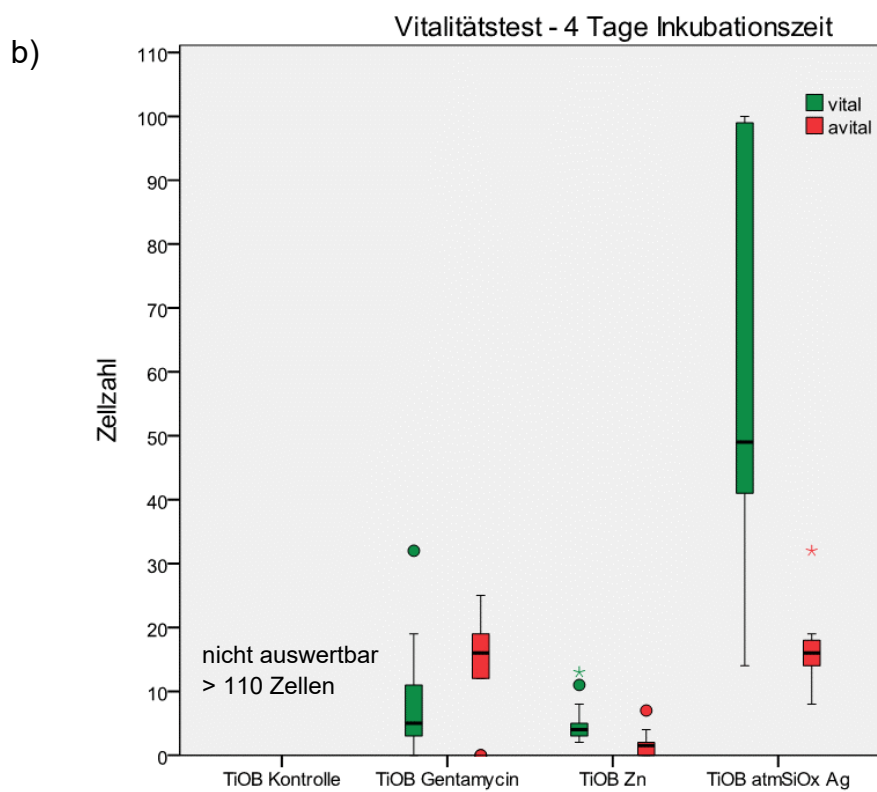
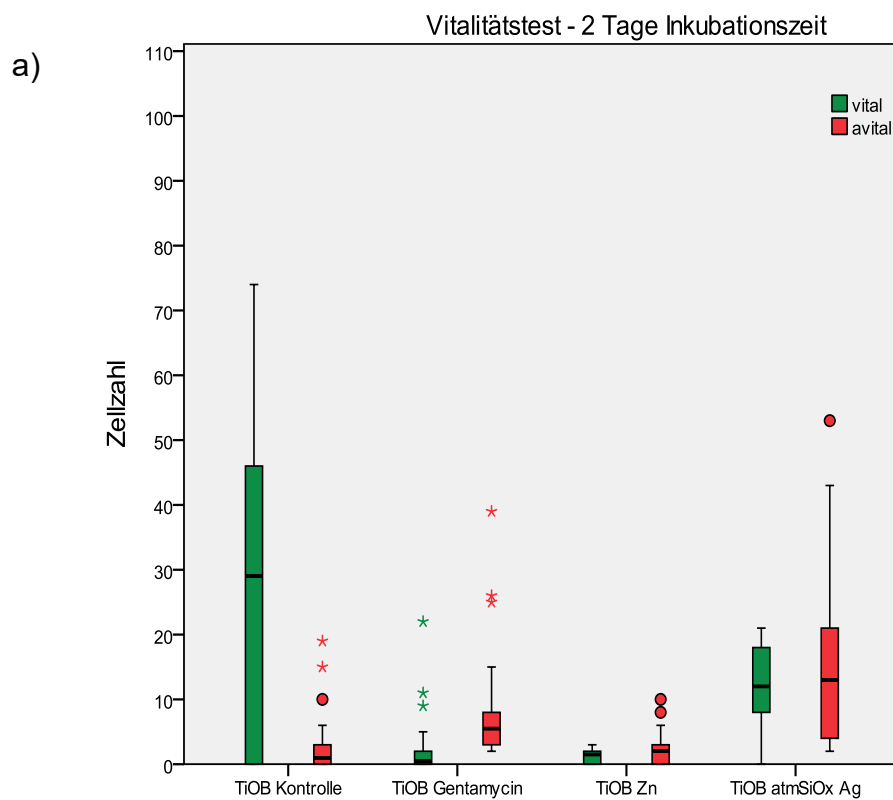


Abb. 10: Vitalitätstest (live/dead-assay; FDA/Ethidiumbromid) MC3T3-Zellen;

a) nach 2 Tagen Inkubation

b) nach 4 Tagen Inkubation mit Mediumwechsel nach 2 Tagen

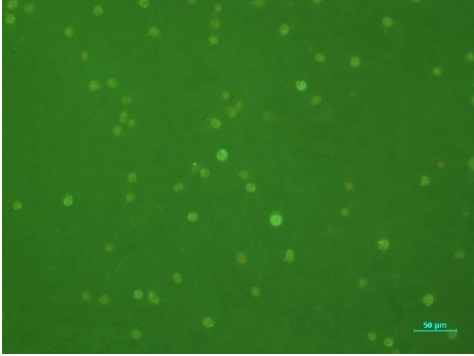
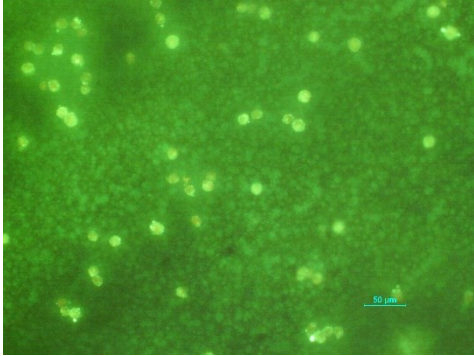
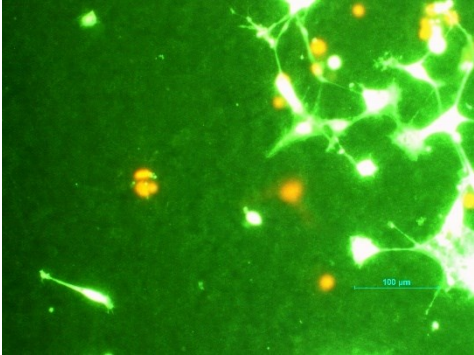
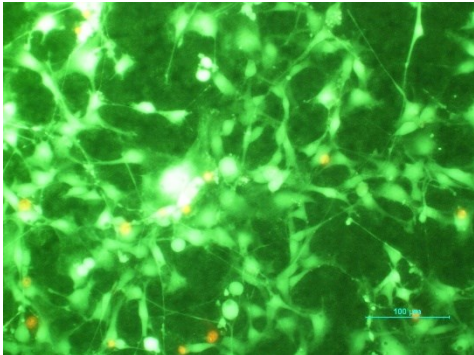
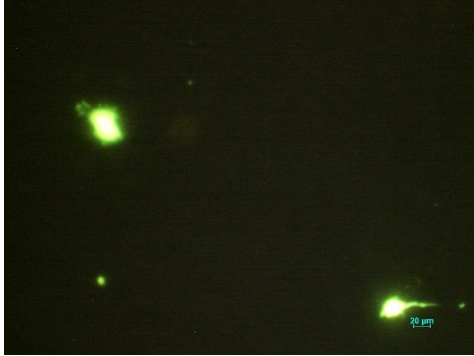
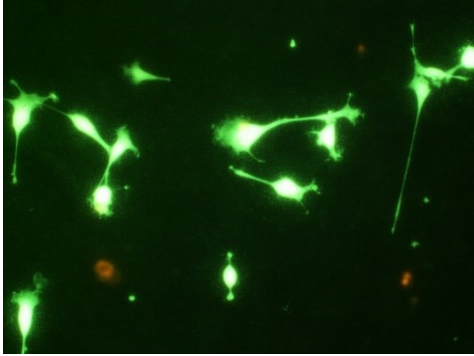
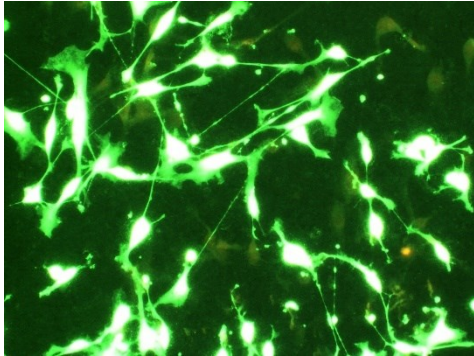
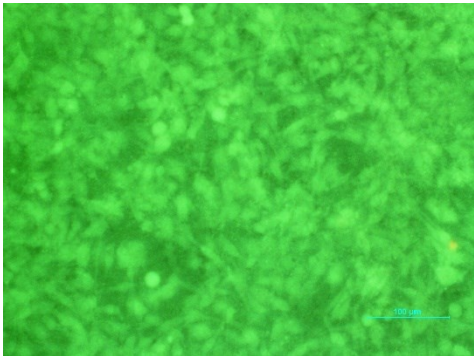
	2 Tage Zellkultur	4 Tage Zellkultur
TiOB [®] Tannin/ Gentamicin		
TiOB [®] SiOx Ag		
TiOB [®] Zn		
TiOB [®] Kontrolle		

Abb. 11: Exemplarische Aufnahmen von MC3T3 Zellen nach 2 bzw. 4 Tagen Inkubation auf verschiedenen Probekörpern mit antibakteriell wirksamen Beschichtungen; Vitalfärbung mit FDA (grün –vital) und Ethidiumbromid (rot – avital)

6 Diskussion

Implantat-assoziierte Infektionen mit Beteiligung von *S. aureus* sind gefürchtete Komplikationen in der orthopädischen Chirurgie und können beispielsweise im Operationsgebiet eine Osteomyelitis auslösen.

Dabei spielt besonders die Ausbildung eines pathogenen Biofilms auf der Implantatoberfläche *in vivo* eine entscheidende Rolle. Wie verschiedene Studien bisher zeigen konnten, könnte die Kolonisation der Implantatoberfläche durch eine antimikrobiell wirksame Funktionalisierung unterbunden werden (Gollwitzer et al. 2003, Harrasser et al. 2015, Harrasser et al. 2016).

In der vorliegenden Studie wurden TiOB® Oberflächen mit einem antibakteriell wirksamen Gehalt des Antibiotikums Gentamicin bzw. Silber- oder Zink funktionalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich für jede dieser untersuchten Oberflächen eine antibakterielle Wirksamkeit auf *S. aureus* nachweisen lässt.

Besonders für TiOB® Tannin/Gentamicin und TiOB® Zn konnte ein wachstumsinhibierender Effekt auf die Vermehrungsfähigkeit von *S. aureus* beobachtet werden. Die insgesamt abnehmende antibakterielle Wirksamkeit über den Testzeitraum wirkte sich positiv auf die Zytokompatibilität von MC3T3 Zellen aus.

Neben der routinemäßig systemischen perioperativen Antibiotikaprophylaxe führt auch die lokale Applikation von Antibiotika bereits zu klinisch verminderten post-operativen Infektionsraten (Trippel 1986, Bengtson et al. 1989, Blackburn und Alarcon 1991, Lucke et al. 2005, Lawing et al. 2015).

Entscheidende Vorteile der lokalen antibiotischen Prophylaxe sind die Zugänglichkeit hoher Dosen des antibiotischen Wirkstoffes auch in die avaskulären Bereiche und die Minimierung von Nebenwirkungen, die bei der systemischen Gabe von Antibiotika auftreten können (Lucke et al. 2005, Cui et al. 2013). So haben sich in den letzten Jahren verschiedene Techniken der lokalen Antibiotika-Applikation in der Klinik durchsetzen können.

Dabei sind u.a. Gentamicin-versetzte Knochenzemente und mit Antibiotika imprägnierte Kollagenschwämme in der Endoprothetik als lokale Antibiotika-Carrier bewährt, diese sind jedoch auf bestimmte Operationen limitiert. (Hettfleisch und Schottle 1993, Stemberger et al. 1997).

Die lokale antibiotische Prophylaxe bei der zementfreien Implantation erfordert entweder die lokale Applikation mittels Injektion oder wie in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, die Funktionalisierung der Implantatoberfläche mit antibakteriellen Substanzen (Lawing et al. 2015).

Bis heute besteht jedoch in der Methodik der Applikation eines antibiotischen Wirkstoffes, an der Grenzfläche Implantat/Gewebe als limitierender Faktor der effizienten lokalen antibiotischen Prophylaxe, das entscheidende Problem.

Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, eine neuartige Gentamicin-beladene Oberfläche zu entwickeln, die eine möglichst effiziente lokale antibiotische Prophylaxe ermöglichen kann.

Auch andere Arbeitsgruppen versuchten, durch verschiedene Kopplungsverfahren Gentamicin-beladene Oberflächen zu generieren. Hierbei sind vor allem die Funktionalisierung mittels Gentamicin-beladener Nanotubes oder PDLL + Gentamicin beschichtete Oberflächen bisher am besten untersucht (Lucke et al. 2003, Lin et al. 2014).

Im Vergleich zu den oben genannten Studien war die Herstellung der Oberfläche in der vorliegenden Studie relativ einfach zu handhaben, schnell realisierbar und kostengünstig. Mit Hilfe eines einfachen Tauchverfahrens (Dip Coating) wurde ein Tannin/Gentamicin Komplex auf TiOB® Oberflächen aufgebracht.

Tannine sind pflanzliche Gerbstoffe, die in zwei Gruppen unterteilt werden können: kondensierbare Tannine oder hydrolisierbare Tannine.

In der vorliegenden Studie wurde das hydrolisierbare Tannin als Immobilisat genutzt, um Gentamicin in einem Komplex zu binden und auf der Implantatoberfläche aufbringen zu können. Dabei ist erwähnenswert, dass im Unterschied zu oben genannten Studien, dass Immobilisat (Tannin) selbst Anti-Biofilm-Aktivitäten *in vitro* aufzeigt.

Lee et al. untersuchten 498 verschiedene Pflanzenextrakte hinsichtlich der Inhibition der Biofilmbildung von *S. aureus*. Dabei stellte sich heraus, dass vor allem die Extrakte Tannin und Quercetin der Pflanze *Alnus japonica* die Biofilm-Formation von *S. aureus* supprimieren können (Lee et al. 2013). Die Inhibition der Biofilmbildung wird wahrscheinlich durch die Transglycosylase IsaA erreicht (Payne et al. 2013).

Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung von antibakteriell funktionalisierten Oberflächen *in vitro* ist die Wirkstofffreisetzungskinetik der inkorporierten antimikrobiellen Stoffe.

In der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst mittels Agardiffusionstest die Wirkstofffreisetzung der antibakteriellen Materialien in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionszeiten in PBS untersucht (Abb. 6). Es konnte gezeigt werden, dass die Eluate der TiOB® Tannin/Gentamicin Probekörper über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 Stunden, Inhibitionszonen auf *S. aureus* erzeugten. Somit kann man davon ausgehen, dass innerhalb dieser Inhibitionszonen eine Wirkstoffkonzentration vorherrscht, die zu einer vollständigen Suppression von *S. aureus* führt.

Die größten Inhibitionszonen gegenüber der Testspezies wiesen die Eluate ohne bzw. nach nur kurzer Expositionszeiten in PBS auf (< 4 h).

Es ist davon auszugehen, dass sich aufgrund der guten Wasserlöslichkeit des Trägermaterials Tannin, der größte Teil des antibakteriellen Produkts bereits in den ersten Stunden vom Probekörper ablöst.

Diese hohe initiale Wirkstofffreisetzung (burst effect) führt zu einer hohen Konzentration der antibakteriellen Substanz im periimplantären Raum.

Dadurch könnten in der entscheidenden Phase, kurz nach der Operation, planktonische Bakterien im Operationsgebiet ausreichend supprimiert werden und somit die bakterielle Besiedlung der Implantatoberfläche, der initiale Schritt der Biofilmbildung, inhibiert werden (Gristina et al. 1987b, Poelstra et al. 2002).

Lin et al. konnten ebenfalls eine hohe initiale Wirkstofffreisetzung von Gentamicin-beladenen Titan-Nanotubes feststellen. Innerhalb von 57 h wurde dabei in dieser Untersuchung in Abhängigkeit vom Durchmesser der Nanotubes ein Großteil des Gentamicins aus den Nanotubes freigesetzt (Lin et al. 2014).

Auch Lucke et al. stellten eine initial hohe Freisetzung von Gentamicin aus PDLLA beschichteten Titanimplantaten fest. Nach 48 h waren 80 % des Gentamicins herausgelöst (Lucke et al. 2003). Bei beiden aufgeführten Studien verblieb jedoch ein Rest des antibiotischen Wirkstoffes in der funktionalisierten Oberfläche zurück.

Auch in der vorliegenden Studie ist davon auszugehen, dass nach initial hoher Freisetzungsmenge, der Überrest des Gentamicins nach 48 h durch Diffusion aus dem Immobilisat Tannin noch über einen unbestimmten Zeitraum kontinuierlich freigesetzt wird.

Dieser Umstand der kontinuierlichen Freisetzung von „low-level“ Antibiotika aus funktionalisierten Oberflächen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum einen könnten überlebende Bakterien supprimiert und dadurch die Vermehrung und Rekolonisierung der Implantatoberfläche verhindert werden (Moskowitz et al. 2010). Zum anderen ist aber auch möglich, dass „low-level“ Freisetzungsmengen von Antibiotika zur Entwicklung von resistenten Bakterienstämmen führen (Wahlig und Dingeldein 1980, Lucke et al. 2003). Eine optimale Freisetzungskinetik lokaler Antibiotika-Carrier ist unter diesem Aspekt bisher noch nicht etabliert worden (Diefenbeck et al. 2016).

Die antibakterielle Wirksamkeit der TiOB® Tannin/Gentamicin Probekörper wurde in der vorliegenden Studie auch im Proliferationstest bestätigt. Die Proliferation von Bakterien gilt als wichtiger Schritt bei der Entwicklung einer Infektion und sollte zur Evaluation von antibakteriellen Oberflächeneigenschaften berücksichtigt werden (Bechert et al. 2000).

Andere Arbeitsgruppen die vergleichbare Untersuchungen wie die hier vorliegende Studie durchführten, konzentrierten sich zumeist nur auf die Bestimmung der Wirkstofffreisetzungskinetik und der bakteriellen Adhärenz an funktionalisierten Oberflächen, jedoch nicht auf die Analyse der mikrobiellen Proliferation adhärenter Bakterien (Vester et al. 2010, Kittinger et al. 2011, Cui et al. 2013).

Um eine präzise Aussage über die antibakterielle Effektivität einer funktionalisierten Oberfläche treffen zu können, muss unserer Meinung nach jedoch das Potential adhärenter Bakterien hinsichtlich ihrer Vermehrungsfähigkeit bestimmt werden.

Im Proliferationstest konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die an den Testoberflächen adhärenen Bakterien so stark geschädigt waren, dass die Vermehrungsfähigkeit gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert war.

Als antibakterieller Effekt, im Vergleich zur Kontrolle, wurde ein verzögerter Anstieg der Proliferationskurven (Latenzphase) gewertet. Obwohl alle untersuchten TiOB® Tannin/Gentamicin Probekörper das Bakterienwachstum im Vergleich zur TiOB® Kontrolle signifikant inhibieren konnten, bestätigt sich auch hier eine Abhängigkeit der Wirksamkeit von der zuvor induzierten Wirkstofffreisetzung durch vorangegangene Lagerung in PBS.

Eine wesentliche Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist, dass wahrscheinlich durch die antibakterielle Funktionalisierung mit Tannin/Gentamicin die nachweisbar besseren

osteointegrativen Eigenschaften von bioaktiven TiOB® Oberflächen nicht substantiell beeinträchtigt werden (Diefenbeck et al. 2011, Diefenbeck et al. 2016).

Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests zeigten, dass im gewählten Untersuchungszeitraum die vitalen, grün fluoreszierenden Zellen noch durch eine runde, kugelige Zellgeometrie auffielen, da wahrscheinlich der Prozess der Ablösung des Tannin/Gentamicin-Wirkstoffkomplexes noch nicht beendet war (Abb. 11). Auch die Ergebnisse des Agardiffusionstests, mit Eluaten nach 48 h Lagerung in PBS unterstreichen diese Hypothese. Durch die noch nicht vollständige Ablösung des Wirkstoffkomplexes nach 48 h und nur einem Nährmediumwechsel nach 2 Tagen könnte die Zelladhärenz von MC3T3 Zellen gestört worden sein.

Es ist anzunehmen, dass unter *in vivo* Bedingungen durch den vorhandenen Stoffaustausch der Prozess der Ablösung noch beschleunigt wird und somit die bioaktive TiOB® Oberfläche schneller zum Vorschein kommt.

Diese Vermutung bekräftigt die Tatsache, dass Tannine biologisch abbaubar sind (Pena et al. 2010). Sahiner et al. konnten in einer Studie feststellen, dass poly Tannin Hydrogel bei einem pH von 9 innerhalb von 9 Tagen vollständig hydrolytisch abgebaut wurde (Sahiner et al. 2016). Im Gegensatz dazu sind beispielsweise Polylactide- (PLA) basierte-Carrier nicht vollständig, oder nur sehr langsam biologisch abbaubar und verbleiben eine lange Zeit im Körper (Maiborodin et al. 2013). So zeigen *in vitro* Untersuchungen, dass 87 % der poly-L-lactide (PLLA) noch nach 6 Wochen nachweisbar waren (Kalicke et al. 2006).

In der vorliegenden Studie konnte nach dem Nährmediumwechsel und einer viertägigen Inkubationszeit eine Zunahme vitaler Zellen und somit bereits eine Verbesserung der Biokompatibilität erzielt werden.

Die TiOB® SiOx Ag Probekörper wurden in der vorliegenden Studie mit Hilfe des bereits beschriebenen APCVD Verfahrens hergestellt (Abb. 2). Als Resultat entsteht auf TiOB® Oberflächen eine ca. 100 nm dünne Siliziumoxidschicht mit eingebetteten Silbernanopartikeln (Ag NPs) in einer Konzentration von ca. 5 At.-%.

Der Vorteil dieser Beschichtungsmethode gegenüber anderen Verfahren, wie z.B. des Polymer-Coatings mit eingebetteten Ag NPs ist, dass hierfür kein Vakuum benötigt wird und somit die Prozessbedingungen deutlich vereinfacht werden können (Biederman et al. 1996, Boldyryeva et al. 2003, Hlíděk et al. 2008, Beier et al. 2013, Beier et al. 2015).

Die Eluate der TiOB[®] SiOx Ag Probekörper erzeugten keine Inhibitionszonen im Agardiffusionstest (Abb. 3). Dies deutet darauf hin, dass die Liquidationsrate von Ag NPs und die Diffusion von Silberionen aus der Schicht nicht ausreichten, um eine antibakterielle Wirksamkeit in diesem Test zu erzeugen.

Auch in anderen Studien u.a. von Juan et al. und Ahaern et al. konnten ebenfalls im Agardiffusionstest keine Inhibitionszonen um silberbeschichtete Titanoberflächen beobachtet werden (Ahearn et al. 1995, Juan et al. 2010).

Mit Hilfe des Proliferationstestes konnte jedoch gezeigt werden, dass TiOB[®] SiOx Ag Probekörper die Vermehrungsfähigkeit des Testkeims *S. aureus* signifikant inhibieren konnten (Abb. 8, 9b). Die antibakterielle Wirkung ist aber wahrscheinlich auf die Oberfläche der Probekörper bzw. deren unmittelbare Umgebung beschränkt.

Das große Oberflächen-Volumen-Verhältnis von Ag NPs erlaubt dabei vermutlich einen effektiveren direkten Kontakt mit den Mikroorganismen. Gleichzeitig kommt es durch die Penetration von Wasser in die Siliziummatrix zum Herauslösen von Silberionen aus den eingelagerten Ag NPs durch Hydratation (Necula et al. 2012). Diese herausgelösten Silberionen interagieren mit den essentiellen thiol (sulfhydryl) Gruppen der bakteriellen Enzyme und führen zu deren Inaktivierung (Feng et al. 2000, Jaiswal et al. 2010).

Jaiswal et al. und Feng et al. diskutierten außerdem, dass es zu einer Inhibition der DNA-Replikation sowie zu einer Reduktion der ATP-Konzentration im bakteriellen Mikroorganismus kommen kann (Feng et al. 2000, Jaiswal et al. 2010).

Silberionen reagieren außerdem mit Phospholipiden der bakteriellen Zellmembran und können so zur Zellyse führen. Ag NPs tragen wahrscheinlich außerdem zur Bildung von Sauerstoffradikalen bei, die dann die bakterielle Zellmembran penetrieren und letztlich DNA- Schädigungen und Protein-Oxidationen bewirken (Morones et al. 2005). Tendenziell konnte in der vorliegenden Studie vor allem durch die TiOB[®] SiOx Ag Probekörper ohne bzw. eine nur kurze vorangegangene Expositionszeit in PBS (0, 4 h) eine signifikante Hemmung der Vermehrungsfähigkeit von *S. aureus* beobachtet werden (Abb. 9b). Dies lässt auch für diese Oberflächenfunktionalisierung auf einen initialen burst effect schließen.

Dieser burst effect könnte durch das beschriebene Herauslösen von Silberionen aus Ag NPs durch Hydratation in wässrigem Medium begründet sein, wobei auf Grund des Herstellungsprozesses besonders in den oberen Lagen der Beschichtung von einer hohen Ag NP Akkumulation ausgegangen werden muss (Beier et al. 2013).

Die Ergebnisse der XPS Untersuchungen der vorliegenden Studie bestätigen dies (Abb. 4a). Zum einen könnte die hohe Konzentration von Silberionen planktonische Bakterien im periimplantären Raum in der initialen Phase kurz nach der Operation supprimieren und so die postoperative Infektion verhindern bzw. die primäre Wundheilung verbessern (Zhao et al. 2011).

Zum anderen wird das Risiko der Resistenzbildung und Toleranzentwicklung von Bakterien gegenüber Silberionen minimiert. Diese könnte bei einer konstant niedrigen Silberionenkonzentrationen über einen längeren Zeitraum auftreten (Wright et al. 1998, Bayston et al. 2007).

TiOB[®] SiOx Ag Probekörper, die länger in PBS exponiert waren (6, 12, 24, 48 h) zeigten keine antibakterielle Wirksamkeit mehr. Lischer et al. beobachteten ähnliche Effekte von mit silberbeladenen Plasma Polymer Beschichtungen (Lischer et al. 2011). Auch hier wurde eine Abhängigkeit der antibakteriellen Effektivität der Probekörper von der vorangegangenen Expositionszeit in PBS beobachtet. Probekörper, die nicht vorher in PBS exponiert waren, führten zu einer vollständigen Inhibition des Bakterienwachstums, währenddessen Probekörper mit vorangegangener Exposition ihre antibakterielle Wirkung verloren (Lischer et al. 2011).

Bei guter antibakterieller Effizienz wird häufig eine ungenügende Zytokompatibilität bei zu hohen Dosen von Silber beschrieben (Ramstedt et al. 2009, Agarwal et al. 2010). Dabei wird sowohl der Kontakt mit Silberionen als auch mit nanopartikulärem Silber kritisch diskutiert (Navarro et al. 2008, Kim et al. 2009).

In der vorliegenden Studie wurden TiOB[®] SiOx Ag Probekörper mit MC3T3 Zellen besiedelt.

Im Gegensatz zu der Untersuchung von Lischer et. al erfolgte keine Präinkubation der Probekörper für 24 h in einem Zellmedium. So war es in der vorliegenden Untersuchung möglich, den kumulativen zytotoxischen Effekt von freien Silberionen, sowie in der Schicht integrierten Ag NPs gegenüber MC3T3 Zellen zu beobachten (Lischer et al. 2011). Während in der vorliegenden Studie nach zwei Tagen Inkubation ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis von vitalen und avitalen Osteoblasten vorlag, konnte bereits nach vier Tagen Inkubation und Nährmediumwechsel ein ähnlich dichter Zellrasen wie in der Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 10, 11). Die vitalen Zellen auf diesen Oberflächen hatten eine typische flach ausgestreckte Form und deuten somit auf eine Zellmorphologie adhärenter Osteoblasten hin. Es ist

anzunehmen, dass der initiale zytotoxische Effekt unter *in vivo* Bedingungen durch den vorhandenen Stoffaustausch noch weiter minimiert werden könnte.

Die Herstellung der TiOB® Zn Probekörper erfolgte in der vorliegenden Studie in zwei aufeinander folgenden plasmachemischen Oxidationsprozessen. Zuerst wurde mit Hilfe des TiOB® Elektrolyts eine Grundbeschichtung auf der Basis von Calciumphosphat aufgebracht und nachfolgend die Einlagerung von Zinkionen durch eine Sekundärbeschichtung in einem zinkhaltigen Folgeelektrolyt gewährleistet.

Bei einer Endspannung von 350 V entsteht eine bis zu 13 µm dicke haftfeste Konversionsschicht keramischen Charakters. Dabei sind im Rasterelektronenmikroskop deutlich die homogen verteilten Plasmakanäle mit einer Größe von 1- 3 µm zu sehen, in denen durch den zweiten Beschichtungsprozess Zinkpartikel eingelagert wurden (Abb. 5).

Mit Hilfe der oberflächensensitiven Photoelektronenspektroskopie (XPS) konnte gezeigt werden, dass Zink durch den plasmachemischen Oxidationsprozess erfolgreich in die Oberfläche eingebracht werden kann (Abb. 4b).

Das Zn(2p) Signal liegt dabei bei einer Bindungsenergie von 1020,8 eV. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Hu et al. bei der Untersuchung plasmachemisch oxidierten Titanimplantate mit inkorporierten Zinkpartikeln. Auch sie konnten einen elementspezifischen Peak von Zn(2p) bei 1021,7 eV detektieren (Hu et al. 2012). Neben der Aussage über die Bindungsenergie konnte mit Hilfe der XPS Messung in der vorliegenden Studie auch eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung der Oberflächenschicht getroffen werden. Die Messungen verdeutlichten, dass Zink mit einem Anteil von bis zu 20 At.-% Zink bis zu einer Schichttiefe von einem Nanometer (10 s Ar⁺) erfolgreich in die Konversionsschicht eingebaut wurde.

Hu et al. konnten bei einer annähernd gleichen Zinkkonzentration im Beschichtungselektrolyt nur ein Anteil von 9 At.-% bei gleicher Schichttiefe detektieren (Hu et al. 2012).

Die antibakterielle Aktivität der in der vorliegenden Studie untersuchten TiOB® Zn Oberflächen konnte in den anschließenden mikrobiologischen Tests verifiziert werden. Die Eluate der TiOB® Zn Probekörper erzeugten im Agardiffusionstest ebenso wie die TiOB® SiOx Ag Probekörpern keine Inhibitionszonen (Abb. 6).

Aufgrund des Herstellungsprozesses kann man davon ausgehen, dass komplexstabilisierte Zinkionen vor allem in den oberen Atomlagen der Konversionsschicht fest inkorporiert sind. Die daraus resultierende geringe Liquidationsrate der chemisch

stabilen Verbände könnte der Grund für die fehlende messbare antibakterielle Wirkung im Agardiffusionstest sein.

Auch Hu et al. konnten keine Freisetzung von Zinkionen aus der von ihnen untersuchten Oberfläche ermitteln (Hu et al. 2012). In Folge der direkten Inkubation der Bakteriensuspension mit den TiOB[®] Zn Probekörpern im Proliferationstest der vorliegenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass alle untersuchten TiOB[®] Zn Probekörper, in Abhängigkeit von der vorangegangenen Expositionszeit in PBS, zu einer Vitalitätseinschränkung bei den exponierten Bakterien führten (Abb. 9c).

Der verzögerte Anstieg der Proliferationskurven und die geringe Bakteriendichte am Ende des Beobachtungszeitraums nach 24 h sprechen dafür, dass adhärente Bakterien an der TiOB[®] Zn Oberfläche so stark geschädigt wurden, dass die Vermehrungsfähigkeit von *S. aureus* stark eingeschränkt war.

Dieser antibakterielle Effekt direkt an der Oberfläche könnte durch die erhöhte Konzentration von Zink in den oberen Atomlagen erklärt werden, wie die XPS Untersuchung zeigte (Abb. 4b).

Der antibakterielle Effekt von Zink auf *S. aureus* ist durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) wie ¹O₂, HO· oder H₂O₂ auf zinkhaltigen Oberflächen erklärbar (Raghupathi et al. 2011).

In der vorliegenden Studie konnte im Proliferationstest mit TiOB[®] Zn Probekörpern im Gegensatz zu TiOB[®] SiOx Ag Probekörpern auch nach der maximalen Expositionszeit in PBS (48 h) ein signifikanter wachstumsinhibierender Effekt auf die Testspezies beobachtet werden (Abb. 9c). Allerdings zeigt die vorliegende Studie auch, dass die Effektivität des Prozesses der Sauerstoffradikalbildung mit der Zeit wahrscheinlich abnimmt.

Im Gegensatz zu Hu et al. die die antibakterielle Wirkung nur in Abhängigkeit vom unterschiedlichen Zinkionengehalt untersuchten, wird in der vorliegenden Studie erstmals gezeigt, dass die Präinkubation in wässrigem Medium (PBS) die antibakterielle Wirksamkeit ebenfalls beeinflusst (Hu et al. 2012).

Aus diesem Grund kann man schlussfolgern, dass die antibakterielle Aktivität von Titanoberflächen, die auf Grundlage der plasmachemischen Oxidation mit Zink funktionalisiert wurden, zum einen von der vorangegangenen Expositionszeit in PBS und zum anderen von dem Gehalt an inkorporierten Zinkionen abhängig ist.

Im Zytotoxizitätstest konnte gezeigt werden, dass nach zwei Tagen Inkubation mit MC3T3 Zellen eine ähnlich geringe Zelldichte wie bei TiOB® Tannin/Gentamicin nachweisbar ist (Abb. 10, 11).

Auch hier fielen die grün fluoreszierenden Zellen durch eine runde, kugelige Form auf, die auf eine ungenügende Adhärenz schließen lässt (Abb. 11). Grund dafür könnte der hohe Gehalt von bis zu 20 At.-% an Zinkionen in den oberen Atomlagen sein, der anfänglich zu einer hohen antibakteriellen Wirkung führt und Zelladhärenz verhindert. Hohe Konzentrationen von ROS können neben der Suppression von Bakterien auch zu Störungen des Zellmetabolismus der körpereigenen Zellen führen (Zaveri et al. 2010).

Nach dem Wechsel des Nährmediums und einer viertägigen Inkubation konnte jedoch zum einen die Zunahme an vitalen Zellen beobachtet werden und zum anderen die Änderung der Zellmorphologie in eine typisch, flach ausgestreckte Zellgeometrie der adhären Osteoblasten (Abb. 11).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten funktionalisierten TiOB® Oberflächen zu einer signifikanten Verminderung der Vermehrungsfähigkeit von *S. aureus* führen. Demnach können alle untersuchten Probekörper als aktive Oberflächenfunktionalisierungen bezeichnet werden, da die primär antimikrobiell inerte TiOB® Oberfläche durch die Integration von Tannin/Gentamicin, Ag oder Zn antibakteriell wirksam wird (Romano et al. 2015). Aufgrund der verschiedenen Herstellungsprozesse, lassen sich allerdings unterschiedliche antibakterielle Wirkungsmechanismen der funktionalisierten TiOB® Oberflächen erkennen. TiOB® Tannin/Gentamicin Probekörper führen durch Wirkstofffreisetzung („drug eluting“) zu einer signifikanten Wachstumsreduktion von *S. aureus*.

TiOB® SiOx Ag und TiOB® Zn Oberflächen zeigen dagegen eine antibakterielle Potenz nur bei adhären Bakterien („contact killing“).

Außerdem spricht die vorliegende Arbeit dafür, dass durch die verschiedenen antibakteriellen Funktionalisierungen der TiOB® Oberflächen, die osteointegrativen Eigenschaften von bioaktiven TiOB® Oberflächen wahrscheinlich nicht wesentlich beeinträchtigt werden.

7 Schlussfolgerungen

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, konnten auf TiOB® Oberflächen durch unterschiedliche Herstellungsverfahren antibakterielle Funktionalisierungen erzielt werden.

Die beschriebenen Methoden waren geeignet, die antibakterielle Wirkung der funktionalisierten Oberflächen zu untersuchen.

Die Ergebnisse des Agardiffusionstests und Proliferationstests zeigen, dass aus verschiedenen Herstellungsverfahren der Oberflächen unterschiedliche antibakterielle Wirkmechanismen resultieren.

Mit TiOB® Tannin/ Gentamicin-Oberflächen ist eine Wirkstofffreisetzung möglich und es bilden sich Inhibitionszonen gegenüber *S. aureus* aus. Die antibakterielle Wirkung von TiOB® SiO_x Ag und TiOB® Zn findet dagegen in direktem Kontakt unmittelbar auf der Oberfläche statt.

Die vorliegenden Resultate des Proliferationstests zeigen eine antibakterielle Wirkung der Oberflächen in Abhängigkeit von der vorangegangenen Exposition in PBS.

Die antibakterielle Funktionalisierung der untersuchten Oberflächen könnte sich in den ersten zwei Tagen nach Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Funktionalisierung zunächst reduzierend auf die Zytokompatibilität auswirken.

Es wurde allerdings beobachtet, dass mit abnehmender antibakterieller Wirkung der Testoberflächen, die Zytokompatibilität wieder deutlich zunimmt.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um eine Optimierung der Implantatoberflächen hinsichtlich einer optimalen antibakteriellen Wirkung bei uneingeschränkter Zytokompatibilität für zukünftige klinische Anwendungen zu entwickeln.

8 Literaturverzeichnis

- Agarwal A, Weis TL, Schurr MJ, Faith NG, Czuprynski CJ, McAnulty JF, Murphy CJ, Abbott NL. 2010. Surfaces modified with nanometer-thick silver-impregnated polymeric films that kill bacteria but support growth of mammalian cells. *Biomaterials*, 31 (4):680-690.
- Ahearn DG, May LL, Gabriel MM. 1995. Adherence of organisms to silver-coated surfaces. *J. Ind. Microbiol.*, 15 (4):372-376.
- Ahrens H, Gosheger G, Streitbürger A, Gebert C, Harges J. 2006. Antimikrobielle Silberbeschichtung von Tumorprothesen. *Der Onkologe*, 12 (2):145-151.
- An YH, Stuart GW, McDowell SJ, McDaniel SE, Kang Q, Friedman RJ. 1996. Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro. *J. Orthop. Res.*, 14 (5):846-849.
- Bayston R, Mills A, Howdle SM, Ashraf W. 2007. Comment on: the increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J. Antimicrob. Chemother.*, 60 (2):447; author reply 447-448.
- Bechert T, Steinrucke P, Guggenbichler JP. 2000. A new method for screening anti-infective biomaterials. *Nat. Med.*, 6 (9):1053-1056.
- Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herrmann M. 2001. Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (7):2958-2965.
- Beier O, Pfuch A, Schmidt J, Spange S, Friedrich L. 2015. Biocompatible and bactericidal coatings on Titanium based Implant materials by using of PCO and APCVD, Nanocon 7th int. conf., Brno: ISBN 978-80-87294-63-5, 448 - 453
- Beier O, Pfuch A, Horn K, Weisser J, Schnabelrauch M, Schimanski A. 2013. Low temperature deposition of antibacterially active silicon oxide layers containing silver nanoparticles, prepared by atmospheric pressure plasma chemical vapor deposition. *Plasma Process. Polym.*, 10 (1):77-87.
- Bengtson S, Borgquist L, Lidgren L. 1989. Cost analysis of prophylaxis with antibiotics to prevent infected knee arthroplasty. *BMJ*, 299 (6701):719-720.
- Biederman H, Hlidek P, Pešička J, Slavinska D, Stundžia V. 1996. Deposition of composite metal/C: H films—the basic properties of Ag/C: H. *Vacuum*, 47 (11):1385-1389.
- Blackburn Jr WD, Alarcon GS. 1991. Prosthetic joint infections. A role for prophylaxis. *Arthritis Rheum.*, 34 (1):110-117.

- Boldyryeva H, Hlí P, Biederman H, Slaví D, Choukourov A. 2003. Composite Ag/C: H films prepared by DC planar magnetron deposition. *Thin Solid Films*, 442 (1):86-92.
- Brinker CJ. 2013. Dip Coating. In: Schneller T, Waser R, Kosec M, Payne D. *Chemical Solution Deposition of Functional Oxide Thin Films*. Wien: Springer, 233-261.
- Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P. 2001. *Titanium in medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
- Buchholz HW, Engelbrecht H. 1970. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg.*, 41 (11):511-515.
- Butte D. 2002. *Die anodische Konversionsschichtbildung auf Vanadium und Zirkonium [Dissertation]*. Chemnitz: Technische Universität
- Castellano JJ, Shafii SM, Ko F, Donate G, Wright TE, Mannari RJ, Payne WG, Smith DJ, Robson MC. 2007. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int. Wound J.*, 4 (2):114-122.
- Chua PH, Neoh KG, Kang ET, Wang W. 2008. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials*, 29 (10):1412-1421.
- Cramton SE, Ulrich M, Götz F, Döring G. 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*, 69 (6):4079-4085.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.*, 183 (9):2888-2896.
- Cucarella C, Tormo MA, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, Penades JR. 2002. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect. Immun.*, 70 (6):3180-3186.
- Cui X, Gu Y, Li L, Wang H, Xie Z, Luo S, Zhou N, Huang W, Rahaman MN. 2013. In vitro bioactivity, cytocompatibility, and antibiotic release profile of gentamicin sulfate-loaded borate bioactive glass/chitosan composites. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 24 (10):2391-2403.
- Davey ME, O'toole GA. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64 (4):847-867.
- de Kievit TR, Iglewski BH. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.*, 68 (9):4839-4849.

- Diefenbeck M, Muckley T, Schrader C, Schmidt J, Zankovych S, Bossert J, Jandt KD, Faucon M, Finger U. 2011. The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats. *Biomaterials*, 32 (32):8041-8047.
- Diefenbeck M, Schrader C, Gras F, Muckley T, Schmidt J, Zankovych S, Bossert J, Jandt KD, Volpel A, Sigusch BW, Schubert H, Bischoff S, Pfister W, Edel B, Faucon M, Finger U. 2016. Gentamicin coating of plasma chemical oxidized titanium alloy prevents implant-related osteomyelitis in rats. *Biomaterials*, 101:156-164.
- Doll K, Jongstaphongpun KL, Stumpp NS, Winkel A, Stiesch M. 2016. Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J. Microbiol. Methods.*, 130:61-68
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 8 (9):881-890.
- Dror-Ehre A, Mamane H, Belenkova T, Markovich G, Adin A. 2009. Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival. *J. Colloid Interface Sci.*, 339 (2):521-526.
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52 (4):662-668.
- Flemming H-C, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8 (9):623-633.
- Geipel U, Herrmann M. 2004. Das infizierte Implantat. *Der Orthopäde*, 33 (12):1411-1428.
- Gemeinhardt MM. 2008. Etablierung eines durchflusszytometrischen Tests zur Bestimmung der Zytokompatibilität antiinfektiöser Titanoxidschichten für medizinische Implantate [Dissertation]. München: Technische Universität
- Gilbert P, McBain A, Lindsay S. 2007. Biofilms, multi-resistance and persistence. In: Amábile-Cuevas CF, Hrsg. *Antimicrobial Resistance in Bacteria*. Wymondham: Horizon Bioscience, 77-98
- Gilbert RE, Harden M. 2008. Effectiveness of impregnated central venous catheters for catheter related blood stream infection: a systematic review. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 21 (3):235-245.
- Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A. 2003. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51 (3):585-591.
- Grenho L, Salgado CL, Fernandes MH, Monteiro FJ, Ferraz MP. 2015. Antibacterial activity and biocompatibility of three-dimensional nanostructured porous granules of hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles--an in vitro and in vivo study. *Nanotechnology*, 26 (31):315101.
- Gristina A, Naylor P, Myrvik Q. 1987. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med. Prog. Technol.*, 14 (3-4):205-224.

- Gristina AG. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, 237 (4822):1588-1595.
- Gristina AG, Naylor PT, Myrvik QN. 1991. Mechanisms of musculoskeletal sepsis. *Orthop. Clin. North Am.*, 22 (3):363-371.
- Gristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN. 1987. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials*, 8 (6):423-426.
- Hänle M. 2008. Mikrobiologische Untersuchungen zur antibakteriellen Potenz von Metallionen sowie einer neuartigen antiinfektiösen Titan (IV)-oxid Oberflächenbeschichtung für medizinische Implantate [Dissertation]. München: Technische Universität.
- Harrasser N, Jussen S, Obermeir A, Kmeth R, Stritzker B, Gollwitzer H, Burgkart R. 2016. Antibacterial potency of different deposition methods of silver and copper containing diamond-like carbon coated polyethylene. *Biomater. Res.*, 20:17.
- Harrasser N, Jussen S, Banke IJ, Kmeth R, von Eisenhart-Rothe R, Stritzker B, Gollwitzer H, Burgkart R. 2015. Antibacterial efficacy of titanium-containing alloy with silver-nanoparticles enriched diamond-like carbon coatings. *AMB Express*, 5 (1):77.
- Hartmann HJ. 2009. Vom Extensionsimplantat zur Hightech-Schraube, *ZM*, 99 (22):3078-3086
- Hassenpflug J. 2014. Statusbericht 2014: Mit Sicherheit mehr Qualität [ERPR Statusbericht]. Berlin: ISBN 978-3-9817673-0-8.
- Hettfleisch J, Schottle H. 1993. Local preventive antibiotic treatment in intramedullary nailing with gentamycin impregnated biomaterials. *Aktuelle Traumatol.*, 23 (2):68-71.
- HlÍdek P, Hanuš J, Biederman H, Slavínská D, Pešička J. 2008. Composite Ag/C: H: N films prepared by planar magnetron deposition. *Thin Solid Films*, 516 (14):4581-4586.
- Hu H, Zhang W, Qiao Y, Jiang X, Liu X, Ding C. 2012. Antibacterial activity and increased bone marrow stem cell functions of Zn-incorporated TiO₂ coatings on titanium. *Acta Biomater.*, 8 (2):904-915.
- Huo K, Zhang X, Wang H, Zhao L, Liu X, Chu PK. 2013. Osteogenic activity and antibacterial effects on titanium surfaces modified with Zn-incorporated nanotube arrays. *Biomaterials*, 34 (13):3467-3478.
- Jaiswal S, Duffy B, Jaiswal AK, Stobie N, McHale P. 2010. Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using beta-cyclodextrin as a capping agent. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 36 (3):280-283.
- Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z. 2010. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int. J. Nanomedicine*, 5:261-267.

Kalicke T, Schierholz J, Schlegel U, Frangen TM, Koller M, Printzen G, Seybold D, Klockner S, Muhr G, Arens S. 2006. Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: an in vitro and in vivo study. *J. Orthop. Res.*, 24 (8):1622-1640.

Käßbohrer J. 2002. Aufbau einer Anlage zur anodischen Oxidation unter Funkenentladung: Für die Beschichtung neuer Substratmaterialien und-geometrien [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY. 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro*, 23 (6):1076-1084.

Kittinger C, Marth E, Windhager R, Weinberg AM, Zarfel G, Baumert R, Felisch S, Kuehn KD. 2011. Antimicrobial activity of gentamicin palmitate against high concentrations of *Staphylococcus aureus*. *J. Mater. Sc.i Mater. Med.*, 22 (6):1447-1453.

Komorniczak M. 2009. Bacterial growth curve. [medical illustrations, wikipedia commons]. Gdansk: Medical University

Lawing CR, Lin FC, Dahners LE. 2015. Local Injection of Aminoglycosides for Prophylaxis Against Infection in Open Fractures. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 97 (22):1844-1851.

Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 29 (5):491-499.

Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11 (6):371-384.

Li L-H, Kong Y-M, Kim H-W, Kim Y-W, Kim H-E, Heo S-J, Koak J-Y. 2004. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. *Biomaterials*, 25 (14):2867-2875.

Lin TL, Lu FM, Conroy S, Sheu MS, Su SH, Tang L. 2001. Antimicrobial coatings: a remedy for medical device-related infections. *Med. Device Technol.*, 12 (8):26-30.

Lin WT, Tan HL, Duan ZL, Yue B, Ma R, He G, Tang TT. 2014. Inhibited bacterial biofilm formation and improved osteogenic activity on gentamicin-loaded titania nanotubes with various diameters. *Int. J. Nanomedicine*, 9:1215-1230.

Lischer S, Korner E, Balazs DJ, Shen D, Wick P, Grieder K, Haas D, Heuberger M, Hegemann D. 2011. Antibacterial burst-release from minimal Ag-containing plasma polymer coatings. *J. R. Soc. Interface*, 8 (60):1019-1030.

Liu Y, Zheng Z, Zara JN, Hsu C, Soofer DE, Lee KS, Siu RK, Miller LS, Zhang X, Carpenter D, Wang C, Ting K, Soo C. 2012. The antimicrobial and osteoinductive properties of silver nanoparticle/poly (DL-lactic-co-glycolic acid)-coated stainless steel. *Biomaterials*, 33 (34):8745-8756.

- Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M. 2003. Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*, 32 (5):521-531.
- Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. 2005. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone*, 36 (5):770-778.
- Maiborodin IV, Kuznetsova IV, Beregovoy EA, Shevela AI, Barannik MI, Manayev AA, Maiborodina VI. 2013. Tissue reactions during the degradation of polylactide implants in the body. *Morfologiya*, 143 (3):59-65.
- Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, 3rd, Goldmann DA, Pier GB. 2002. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun.*, 70 (8):4433-4440.
- Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16 (10):2346-2353.
- Moskowitz JS, Blaisse MR, Samuel RE, Hsu HP, Harris MB, Martin SD, Lee JC, Spector M, Hammond PT. 2010. The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit bone model. *Biomaterials*, 31 (23):6019-6030.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R. 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.*, 42 (23):8959-8964.
- Necula BS, van Leeuwen JP, Fratila-Apachitei LE, Zaat SA, Apachitei I, Duszczak J. 2012. In vitro cytotoxicity evaluation of porous TiO₂-Ag antibacterial coatings for human fetal osteoblasts. *Acta Biomater.*, 8 (11):4191-4197.
- Payne DE, Martin NR, Parzych KR, Rickard AH, Underwood A, Boles BR. 2013. Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. *Infect Immun.*, 81 (2):496-504.
- Pena C, de la Caba K, Eceiza A, Ruseckaite R, Mondragon I. 2010. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresour. Technol.*, 101 (17):6836-6842.
- Poelstra KA, Barekzi NA, Rediske AM, Felts AG, Slunt JB, Grainger DW. 2002. Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *J. Biomed. Mater. Res.*, 60 (1):206-215.
- Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir.*, 27 (7):4020-4028.

- Ramstedt M, Ekstrand-Hammarstrom B, Shchukarev AV, Bucht A, Osterlund L, Welch M, Huck WT. 2009. Bacterial and mammalian cell response to poly(3-sulfopropyl methacrylate) brushes loaded with silver halide salts. *Biomaterials*, 30 (8):1524-1531.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Hrsg. 2004. *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. Zweite Aufl. San Diego, London: Elsevier Academic Press.
- Romano CL, Scarponi S, Gallazzi E, Romano D, Drago L. 2015. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama. *J. Orthop. Surg. Res.*, 10:157.
- Sahiner N, Sagbas S, Sahiner M, Silan C, Aktas N, Turk M. 2016. Biocompatible and biodegradable poly(Tannic Acid) hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 82:150-159.
- Sanderink RBA, Zitzmann NU Saxer UP, Schlagenhauf U, Rutger P, Erne P. 2008. Parodontitis und Periimplantitis: in den menschlichen Körper disseminierende Biofilm-Infekte. *Quintessenz*, 59 (3):273-285.
- Sawai J. 2003. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *J. Microbiol. Methods*, 54 (2):177-182.
- Schiefer UR, Heiss C, Dingeldein E, Wenisch S, Schnettler R, Kilian O. 2008. In-Vitro-Untersuchungen zu Elutionskinetiken und antimikrobiellen Wirkungen von Gentacmin- und Clindamycin-haltigen Knochenzementen. *Z. Orthop. Unfall*, 146 (1):92-98.
- Schrader C, Finger U, Henning A, Hüppner A, Pfister M, Schmidt J. 2011. Erzeugung von Oberflächen auf Titanimplantaten mit biologisch funktionellen Eigenschaften zur Verbesserung der Biokompatibilität und Osteoinduktivität. *Galvanotechnik*, 102 (2):242.
- Schrader C, Schmidt J, Diefenbeck M, Mückley T, Zankovych S, Bossert J, Jandt KD, Faucon M, Finger U. 2012. Bioactive TiOB-Coating on Titanium Alloy Implants Enhances Osseointegration in a Rat Model. *Adv. Eng. Mater.*, 14 (3):B21-B27.
- Seil JT, Webster TJ. 2011. Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. *Acta Biomater.*, 7 (6):2579-2584.
- Stemberger A, Grimm H, Bader F, Rahn HD, Ascherl R. 1997. Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge. *Eur. J. Surg. Suppl.*, (578):17-26.
- Teller M, Gopp U, Neumann HG, Kuhn KD. 2007. Release of gentamicin from bone regenerative materials: an in vitro study. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, 81 (1):23-29.
- Trippel SB. 1986. Antibiotic-impregnated cement in total joint arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 68 (8):1297-1302.

- Vester H, Wildemann B, Schmidmaier G, Stockle U, Lucke M. 2010. Gentamycin delivered from a PDLLA coating of metallic implants: In vivo and in vitro characterisation for local prophylaxis of implant-related osteomyelitis. *Injury*, 41 (10):1053-1059.
- Wahlig H, Dingeldein E. 1980. Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations. *Acta Orthop. Scand.*, 51 (1):49-56.
- Waters CM, Bassler BL. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 21:319-346.
- Wiegand C, Beier O, Horn K, Pfuch A, Tolke T, Hippler UC, Schimanski A. 2014. Antimicrobial impact of cold atmospheric pressure plasma on medical critical yeasts and bacteria cultures. *Skin. Pharmacol. Physiol.*, 27 (1):25-35.
- Williams DF, Hrsg. 1987. Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. ESB. Amsterdam, New York: Elsevier.
- Wintermantel E, Ha S-W. 2008. *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Wirtz G, Brown S, Kriven W. 1991. Ceramic coatings by anodic spark deposition. *Mater. Manuf. Process.* 6 (1):87-115.
- Wright JB, Lam K, Burrell RE. 1998. Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. *Am. J. Infect. Control.*, 26 (6):572-577.
- Zaveri TD, Dolgova NV, Chu BH, Lee J, Wong J, Lele TP, Ren F, Keselowsky BG. 2010. Contributions of surface topography and cytotoxicity to the macrophage response to zinc oxide nanorods. *Biomaterials*, 31 (11):2999-3007.
- Zhao L, Wang H, Huo K, Cui L, Zhang W, Ni H, Zhang Y, Wu Z, Chu PK. 2011. Antibacterial nano-structured titania coating incorporated with silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32 (24):5706-5716.
- Ziegler K. 2006. Die Bedeutung der Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* für die bakterielle Persistenz im Respirationstrakt von Patienten mit der Erbkrankheit Mukoviszidose [Dissertation]. Tübingen: Eberhard Karls Universität.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Hiermit möchte ich mich besonders bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. Bernd W. Sigusch, Direktor der Poliklinik für Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Dr. Stefan Kranz, Dr. André Güllmar, Dr. Markus Reise, Dr. Christian Schrader und vor allem Frau Dipl. Ing. Andrea Völpe (†) danke ich sehr für die hervorragende Betreuung und ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die vielen wertvollen Anregungen und die stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern und meiner Frau möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Univ.-Prof. Dr. Dr. Sigusch, Dr. Kranz, Dr. Güllmar, Dr. Reise, Dr. Schrader, Frau Dipl. Ing. Völpe (†), Frau Tonndorf,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gera, 08/11/2020

Tobias Lesser